

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA  
Departamento de Farmacología



## TESIS DOCTORAL

**Implicación del sistema dopaminérgico en las acciones de los  
cannabinoides y psicoestimulantes**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Ana Belén Martín Hernández**

Directora

Rosario Moratalla Villalba

**Madrid, 2014**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacología



Implicación del sistema dopaminérgico en las acciones de  
los cannabinoides y psicoestimulantes.

**TESIS DOCTORAL**

**Ana Belén Martín Hernández**

**Dirigida por Rosario Moratalla Villalba**

**Madrid, 2013**







*A mis padres y hermanos*

*A Miguel Ángel*

*Y para mi pequeña princesa, Lucía*



Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento...

A mi directora de tesis, la Dra. Rosario Moratalla Villalba, por brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, por todo lo que me ha aportado, por la confianza que siempre ha depositado en mí y por su paciencia infinita.

A Emy, por su gran ayuda y apoyo incondicional desde mi primer día en el laboratorio, por sus palabras de ánimo, que han sido muchas...y por todo lo que has compartido conmigo siempre. A Noelia, porque en todo momento me ha aportado una alegría inmensa, por su dedicación e ilusión y por su disposición a ayudarme en todo lo que ha estado en su mano. Muchas gracias, porque con vosotras el camino ha sido más fácil.

A todas aquellas personas que de una forma u otra han colaborado en este proyecto, con las que he compartido tantos buenos momentos. A Nancy, por todas sus enseñanzas; a Cristina, porque comenzamos juntas nuestra formación científica y por esas pequeñas visitas que tanto me gustan; a Carmen, por ofrecerme siempre su ayuda y su trabajo; a Chelo, por su capacidad de ayuda y por tantos ratos de risas y diversión; a Ainhoa, por todo lo que hemos aprendido juntas; a Sanja, por esa forma tan especial de ver las cosas; a Oskar, nuestro chico del laboratorio, por su ayuda con el ordenador; a Vilma, Julia y Patricia por sus ánimos constantes; a Ainhoa Bilbao, por todas esas horas y días de condicionamiento que dedicó a enseñarme y a muchas otras personas entre las que se encuentran, Iván, Ana Julia, Dani, Natalia ..... entre otras.

A los nuevos chicos y no tan nuevos del laboratorio, en especial a Lula, Marco, Irene, Sara e Isabel, que en esta última etapa me han animado tanto y a Ramiro y María por su revisión de la introducción del sistema cannabinoide.

A Sagrario Martín Aragón y M<sup>a</sup> Jesús Oset por su ayuda desde la facultad.

A mis compañeros del Rosario, con los que últimamente comparto muchas de mis inquietudes y de los cuales he recibido mucho ánimo y apoyo constante.

A mi amiga, Ana, por compartir conmigo tantos años y muchos más!! A Ana M<sup>a</sup> y a Marta por sus buenos deseos.

A mis padres, José y Conrada, que han sido siempre mi gran apoyo en todos los proyectos que he iniciado a lo largo de mi vida, porque siempre han estado ahí y siguen estando. A ellos les debo todo lo que he logrado.

A mis hermanos, Jose Pedro y Miguel Ángel, por quererme como me quieren. Y al resto de mi familia, gracias a todos por estar presentes siempre, por vuestra ayuda y por tantas palabras de ánimo.

Y por último y por ser las personas más importantes para mí, a Miguel Angel y a mi hija, Lucía, por todos esos momentos que les ha robado este proyecto, que han sido muchos... Mil gracias a ambos por estar a mi lado día a día.





<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Los ganglios basales.....</b>	<b>3</b>
1.1. Organización anatómica .....	4
- Estriado.....	4
a) Neuronas de proyección espinosas o neuronas espinosas de tamaño medio (MSNs).....	4
b) Interneuronas .....	5
- Globo pálido.....	6
- Núcleo subtalámico .....	7
- Sustancia negra .....	7
1.2. Organización funcional .....	8
- El estriado y sus aferencias .....	8
a) Proyecciones glutamatérgicas estriatales.....	8
b) Proyecciones dopaminérgicas estriatales .....	8
- Compartimentación interna del estriado. Estriosomas y matriz.....	9
- Vías directa e indirecta del estriado .....	11
<b>2. Receptores dopaminérgicos .....</b>	<b>13</b>
2.1. Clasificación, estructura y expresión de los receptores dopaminérgicos.....	14
2.2. Localización de los receptores dopaminérgicos .....	15
<b>3. Sistema dopaminérgico y psicoestimulantes.....</b>	<b>17</b>
3.1. Respuesta conductual a la exposición de psicoestimulantes.....	18
3.2. Respuesta molecular a la exposición de psicoestimulantes: inducción de genes de expresión temprana o factores de transcripción.....	19
3.3. Fenotipo molecular de las neuronas que responden al tratamiento con cocaína .....	20
3.4. Receptores dopaminérgicos implicados en las acciones de los psicoestimulantes..	20
<b>4. Sistema cannabinoide .....</b>	<b>21</b>
4.1. Distribución anatómica de los receptores cannabinoides.....	23
4.2. Mecanismos de transducción de señal asociados a los receptores cannabinoides ..	25
4.3. Endocannabinoides .....	26
4.4. Funcionalidad del sistema cannabinoide endógeno .....	27
- Efectos de los cannabinoides sobre el control motor .....	28
- Efectos de los cannabinoides en la transmisión nociceptiva .....	30
- Efectos de los cannabinoides sobre la regulación de la temperatura corporal ...	32
- Efectos de los cannabinoides sobre el aprendizaje y la memoria.....	32
- Efectos de los cannabinoides sobre la ingesta de alimentos .....	33
- Efectos de los cannabinoides sobre el control emocional.....	34
- Efectos motivacionales de los cannabinoides .....	34

a) Implicación de los receptores cannabinoides en las propiedades adictivas de los cannabinoides .....	35
b) Implicación de la dopamina en las propiedades adictivas de los cannabinoides.....	35
c) Implicación del sistema opioide endógeno en las propiedades adictivas de los cannabinoides .....	37
- Tolerancia y dependencia física a compuestos cannabinoides .....	37
- Síndrome de abstinencia cannabinoide .....	38
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>41</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
<b>1. Animales de experimentación .....</b>	<b>47</b>
<b>2. Genotipo de líneas transgénicas de ratones .....</b>	<b>47</b>
2.1. Genotipo de ratones D <sub>1</sub> R <sup>-/-</sup> .....	47
2.2. Genotipo de ratones D <sub>2</sub> R <sup>-/-</sup> .....	52
<b>3. Estudios comportamentales .....</b>	<b>54</b>
3.1. Drogas y dosis .....	54
3.2. Grooming y movimientos orales .....	54
3.3. Comportamiento rotacional .....	55
3.4. Test de preferencia espacial con agonistas cannabinoides en ratones WT y KO de receptores dopaminérgicos.....	56
3.5. Test de aversión espacial con agonistas cannabinoides en ratones WT y KO de receptores dopaminérgicos .....	57
3.6. Síndrome de abstinencia a cannabinoides en ratones WT y KO de receptores dopaminérgicos.....	58
3.7. Estudios de actividad locomotora espontánea en ratones WT y KO de receptores dopaminérgicos.....	59
- Actividad locomotora inducida por el agonista cannabinoide THC .....	59
- Actividad locomotora inducida por los psicoestimulantes: anfetamina y cocaína .	60
- Actividad locomotora inducida por el agonista dopaminérgico SKF-81297 .....	60
3.8. Estudios de analgesia en ratones WT y KO de receptores dopaminérgicos.....	61
3.9. Estudios de temperatura en ratones WT y KO de receptores dopaminérgicos.....	62
<b>4. Obtención y procesamiento del tejido .....</b>	<b>62</b>
4.1. Obtención y procesamiento del tejido para hibridación <i>in situ</i> y binding .....	62
4.2. Obtención y procesamiento del tejido para inmunohistoquímica.....	63
<b>5. Estudios histológicos .....</b>	<b>64</b>
5.1. Estudios de hibridación <i>in situ</i> .....	64

5.2. Estudios inmunohistoquímicos.....	72
5.3. Estudios de binding de receptor $\mu$ -opioide.....	76
5.4. Estudios de western blott.....	77

## **RESULTADOS..... 79**

<b>1. Determinación del sustrato anatómico, a nivel celular, de la interacción del sistema dopaminérgico con el sistema cannabinoide .....</b>	<b>81</b>
1.1. Expresión del ARN mensajero del receptor CB <sub>1</sub> en los ganglios basales de rata .....	81
1.2. Inmunoreactividad del receptor CB <sub>1</sub> en los ganglios basales de rata .....	85
1.3. Expresión del ARN mensajero del receptor cannabinoide CB <sub>1</sub> en neuronas de proyección estriatales .....	88
1.4. Expresión del ARN mensajero del receptor cannabinoide CB <sub>1</sub> en interneuronas.....	93
<b>2. Modulación de la expresión del receptor CB<sub>1</sub> por el sistema dopaminérgico en ratones D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> Y D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> .....</b>	<b>95</b>
<b>3. Papel funcional del sistema cannabinoide endógeno en respuestas conductuales mediadas por los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> Y D<sub>2</sub>.....</b>	<b>97</b>
3.1. AM 404, bloqueante de la recaptación de anandamida, reduce la respuesta mediada por los receptores D <sub>1</sub> y D <sub>2</sub> en grooming y movimientos orales .....	97
3.2. Efecto opuesto de ligandos cannabinoides y dopaminérgicos sobre el comportamiento rotacional .....	100
3.3. Interacción funcional entre los receptores CB <sub>1</sub> y D <sub>1</sub> : Estudios en ratones D <sub>1</sub> R <sup>-/-</sup> .....	102
<b>4. Papel de los receptores D<sub>1</sub> Y D<sub>2</sub> en las acciones mediadas por los cannabinoides ..</b>	<b>104</b>
4.1. Impacto de la inactivación de los receptores dopaminérgicos en la respuesta motora inducida por THC .....	104
4.2. Impacto de la inactivación de los receptores dopaminérgicos sobre el efecto analgésico inducido por THC .....	106
4.3. Impacto de la inactivación de los receptores dopaminérgicos sobre el efecto hipotérmico inducido por THC.....	108
4.4. Implicación del receptor dopaminérgico D <sub>2</sub> en los efectos motivacionales inducidos por la administración de THC .....	110
4.5. Implicación del receptor dopaminérgico D <sub>2</sub> en los efectos de dependencia inducidos por la administración de THC .....	111
<b>5. Impacto de la inactivación del receptor D<sub>2</sub> en las acciones de los psicoestimulantes .....</b>	<b>114</b>
5.1. La sensibilización comportamental inducida por cocaína y anfetamina es anormal en ratones D <sub>2</sub> R <sup>-/-</sup> .....	114



5.2. Papel de los receptores dopaminérgicos D <sub>2</sub> en la expresión de genes tempranos inducidos por la administración de cocaína y anfetamina .....	117
5.3. La inactivación del receptor de dopamina D <sub>2</sub> disminuye la fosforilación de ERK inducida por cocaína .....	120
5.4. La inactivación del receptor D <sub>2</sub> inhibe la expresión de dinorfina basal y la inducida por cocaína o anfetamina en el estriado .....	121
5.5. La inactivación del receptor D <sub>2</sub> aumenta la expresión basal de encefalina en el estriado, pero no la inducida por cocaína: Estudio en ratones D <sub>2</sub> R <sup>-/-</sup> .....	129
5.6. Fenotipo de neuronas estriatales que expresan c-Fos tras un tratamiento con cocaína .....	130
<b>6. La inactivación del receptor D<sub>2</sub> disminuye los efectos del SKF 81297, agonista selectivo del receptor D<sub>1</sub> .....</b>	<b>133</b>
6.1. La inactivación del receptor D <sub>2</sub> disminuye la actividad locomotora inducida por SKF 81297 .....	133
6.2. La inactivación del receptor D <sub>2</sub> disminuye la expresión de c-Fos inducida por SKF 81297 .....	134
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>137</b>
1. Determinación del sustrato anatómico celular de la interacción del sistema dopaminérgico con el sistema cannabinoide .....	139
2. La inactivación de los receptores dopaminérgicos D <sub>1</sub> y D <sub>2</sub> no modifica la expresión del receptor CB <sub>1</sub> .....	143
3. Papel funcional del sistema cannabinoide endógeno en respuestas conductuales mediadas por los receptores dopaminérgicos D <sub>1</sub> y D <sub>2</sub> .....	144
4. Papel comportamental de los receptores D <sub>1</sub> y D <sub>2</sub> en las acciones mediadas por los cannabinoides .....	151
5. Impacto de la inactivación del receptor D <sub>2</sub> en las acciones de los psicoestimulantes .....	156
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>165</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>169</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>199</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>207</b>

# ***INTRODUCCIÓN***



## **1. LOS GANGLIOS BASALES.**

En humanos, se ha demostrado que la neurodegeneración de diferentes niveles de los ganglios basales es la causa de desórdenes del movimiento que dan lugar a disfunciones hipocinéticas o hipercinéticas, como la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington (Crossman, 1987; Albin y cols., 1989; Graybiel, 1990). Una función crítica de los ganglios basales es el control de la iniciación y selección de los movimientos voluntarios (Albin y cols., 1989; Mink, 1996; Redgrave y cols., 1999). Sin embargo, los ganglios basales no solo están implicados en las funciones motoras sino también en el aprendizaje, en funciones cognitivas y límbicas (Alexander y cols., 1986; Graybiel y cols., 1994; Packard y Knowlton, 2002).

Anatómicamente, los ganglios basales son un grupo de núcleos subcorticales que actúan como una entidad funcional coherente. Sus principales componentes son el estriado, el globo pálido lateral o externo (GPL o GPe), el globo pálido medial o interno (GPM o GPi), los núcleos subtalámicos (STN) y la sustancia negra que está compuesta por la sustancia negra compacta (SNc) y la sustancia negra reticulata (SNr). Todos estos núcleos interconectados forman un circuito altamente organizado y complejo. A finales de los años 80, Albin y colaboradores propusieron un modelo de unificación de la organización funcional de los ganglios basales tanto en condiciones normales como en condiciones patológicas (Albin y cols., 1989). Este modelo estaba basado en las vías dopaminérgicas directa e indirecta. De acuerdo con el modelo, el estriado es la estructura de entrada de los ganglios basales, dicho núcleo recibe principalmente proyecciones glutamatérgicas de casi todas las áreas de la corteza cerebral y del tálamo. El estriado integra la información procedente de las entradas corticales y envía la información procesada a las estructuras de salida de los ganglios basales (SN), a través de las proyecciones estriatonigrales o las estriatopalidales. Estas últimas proyectan primero a dos núcleos intermedios (GPe y STN). Por último, la información procesada vuelve a la corteza motora a través de los núcleos talámicos, cerrándose de esta manera el circuito cortico-talamocortical (Alexander y cols., 1986; Wise y cols., 1996; Gerfen, 2000).

## **1.1. Organización anatómica.**

### **- Estriado.**

El estriado es la principal estructura de entrada de los ganglios basales. En vertebrados superiores, el estriado se divide en dos segmentos separados por una cápsula interna: caudado y putamen. En roedores, el estriado aparece como un sólo núcleo. El estriado es una estructura bastante homogénea, compuesta principalmente por un tipo específico de neuronas espinosas y un pequeño porcentaje de interneuronas. El estriado es el único núcleo que no tiene neuronas glutamatérgicas, en cambio, la mayor parte de las células del estriado son GABAérgicas. El estriado está constituido por dos tipos celulares:

- Neuronas de proyección espinosas.
- Interneuronas.

Las neuronas de proyección son comparativamente mucho más abundantes que las interneuronas y representan el principal elemento que recibe y envía proyecciones al estriado. Mientras que las interneuronas actúan integrando la información que llega al estriado mediando entre las neuronas de proyección.

### **a) Neuronas de proyección espinosas o neuronas espinosas de tamaño medio (MSNs).**

Estas neuronas de proyección GABAérgicas son el tipo celular más abundante en el estriado, representando más del 95% del total de la población neuronal en roedores y el 75-80% en primates (Tepper y cols., 2004; Bertran-Gonzalez y cols., 2008). Estas neuronas son redondeadas y ovales, de tamaño medio, tienen axones largos y emiten múltiples dendritas primarias cubiertas de espinas, por esto se les llama neuronas de proyección medianas o MSN. Se pueden definir dos tipos de poblaciones de MSN en función de sus proyecciones axonales y su contenido en neuropéptidos. Por un lado, las **MSNs estriatonigrales** cuyas fibras proyectan directamente a la SNr y el GPM y posiblemente algunas al GPL (Kawaguchi y cols., 1990; Parent y Hazrati, 1995; Matameles y cols., 2009; Bertran-Gonzalez y cols., 2010) que expresan principalmente dinorfina, sustancia P (Chesselet y Graybiel, 1983; Beckstead y Kersey, 1985), receptor muscarínico M4 (Harrison y cols., 1996) y receptor dopaminérgico D<sub>1</sub> (D<sub>1</sub>R)

(Beckstead, 1988; Gerfen y cols., 1990). Estas neuronas de proyección dan lugar a la *vía directa* del estriado. Y por otro lado, las **MSNs estriatopalidales** que proyectan principalmente al GPL y expresan fundamentalmente encefalina, receptor dopaminérgico D<sub>2</sub> (D<sub>2</sub>R) y receptor de adenosina A<sub>2</sub>A (Gerfen y cols., 1990; Fink y cols., 1992; Le Moine y Bloch, 1995), dando lugar a la *vía indirecta* del estriado. En estudios recientes, se ha estimado que en el estriado dorsal aproximadamente el 50% de las MSNs GABAérgicas expresan exclusivamente D<sub>1</sub>R y el 35-40% expresan D<sub>2</sub>R, mientras que existe otra subpoblación de MSNs en el núcleo accumbens que coexpresan D<sub>1</sub>R y D<sub>2</sub>R (5% en el core y 17% en el shell; Bertran-Gonzalez y cols., 2008; Matamales y cols., 2009).

#### **b) Interneuronas.**

Las interneuronas estriatales representan una pequeña proporción del total de las neuronas estriatales (aproximadamente un 5%) pero tienen un papel crítico en la regulación de la función estriatal. Todas las interneuronas presentan ausencia de espinas en las dendritas, soma más grande que el de las neuronas de proyección y axones cortos que no proyectan fuera del estriado. Clásicamente se han denominado “neuronas sin espinas de gran tamaño” del estriado, aunque su tamaño varía dependiendo de su fenotipo neuroquímico. Las interneuronas se clasifican en función de su tamaño y características neuroquímicas en: células GABAérgicas de tamaño medio y células colinérgicas de gran tamaño (Kawaguchi, 1997).

Las **interneuronas GABAérgicas de tamaño medio** utilizan como neurotransmisor el GABA y se dividen en tres subtipos:

- Las *interneuronas somatostatina / neuropéptido Y / óxido nítrico sintasa* se localizan preferentemente en la matriz alrededor de los estriosomas y sus axones se ramifican principalmente en la matriz. Expresan los neuropéptidos somatostatina, enzima óxido nítrico sintasa y neuropéptido Y.
- Las *interneuronas parvoalbúmina* tienen un tamaño semejante al de las neuronas de proyección del estriado. El soma, las dendritas y los axones se distribuyen indistintamente en la matriz y en los estriosomas y representan el principal tipo de interneurona inhibitoria del estriado.

- Las *interneuronas calretinina* son las más abundantes en el estriado humano y en su mayoría son neuronas de tamaño medio, existiendo también neuronas grandes pero en menor cantidad. Las interneuronas calretinina-positivas de tamaño grande muestran inmunorreactividad para ChAT y expresan receptores de sustancia P. También presentan las subunidades GluR2 y GluR4 del receptor de glutamato.

Las **interneuronas colinérgicas** son las neuronas de mayor tamaño del estriado. Los cuerpos celulares de estas interneuronas se distribuyen de forma homogénea por todo el estriado, sin una localización preferente en la matriz ni en los estriosomas. Neuroquímicamente, se caracterizan por expresar la enzima acetilcolina transferasa y utilizan acetilcolina como neurotransmisor. Estas neuronas expresan abundantemente los receptores D<sub>5</sub> (Rivera y cols, 2002b).

A nivel fisiológico, las interneuronas somatostatina-positivas tienen baja frecuencia de disparo y son conocidas como interneuronas de baja respuesta (low-threshold spiking interneurons, LTS). Las interneuronas parvoalbúmina-positivas presentan una frecuencia de disparo rápida y sostenida y se conocen como interneuronas de respuesta rápida (fast spiking interneurons, FS). Las interneuronas calretinina-positivas aunque no están bien caracterizadas electrofisiológicamente, también pueden presentar algunas características de interneuronas LTS (Tepper y Bolam, 2004; Kreitzer, 2009). Y por último, las interneuronas colinérgicas son las únicas neuronas del estriado activas tónicamente (Tonically active neurons, TAN) en condiciones basales e irregularmente en respuestas a entradas sinápticas excitatorias (Wilson y cols., 1990; Aosaki y cols., 1994).

#### - **Globo pálido.**

El globo pálido es un núcleo subcortical compuesto por dos segmentos: el **globo pálido lateral o externo** (GPL o GPe) y el **globo pálido medial o interno** (GPM o GPi). El GPe es una pequeña estructura inmersa en las fibras de la cápsula interna y también se denomina núcleo entopeduncular (EP). Principalmente, las dos divisiones del complejo palidal están compuestas por neuronas GABAérgicas. La mayoría de las neuronas del GPe son neuronas de proyección GABAérgicas inhibitorias (Difiglia y

cols., 1982). Por otro lado, el GPi junto con la SNr constituyen la estructura de salida de los ganglios basales.

- **Núcleo subtalámico.**

El núcleo subtalámico (STN) es una de las estructuras más pequeñas de los ganglios basales, sin embargo su papel es de gran importancia. El STN tiene la propiedad específica de ser la única estructura excitatoria de los ganglios basales (Kitai y Deniau, 1981; Nambu y cols., 1997; Bevan y cols., 2007). Después del estriado, es considerada como la segunda entrada de la información cortical y talámica dentro de los ganglios basales.

- **Sustancia negra.**

La sustancia negra (SN) está constituida por dos partes principales: la **sustancia negra pars compacta** (SNc) constituida por neuronas densamente compactadas y la **sustancia negra pars reticulata** (SNr), que contiene escasas células distribuidas entre las fibras aferentes constituyendo las terminales estriatonigrales. Existe una tercera parte que se denomina **sustancia negra pars lateralis** (SNl) que está constituida por un pequeño grupo de neuronas y está situada en la parte dorsolateral de la SN. La SNc junto con regiones adyacentes, como el área tegmental ventral (VTA) y el área retrorubral (RRA), constituyen un conjunto de núcleos dopaminérgicos del mesencéfalo que proyectan al estriado, entre otras estructuras. En la rata, Dahlström y Fuxe dividieron estos cuerpos celulares del mesencéfalo que contienen dopamina, en distintos grupos celulares dependiendo de su localización: A8, A9 y A10 (Dahlström y Fuxe, 1964). Las células A8 se localizan predominantemente en el RRA, y son consideradas como una extensión dorsal y caudal de las células A9 que se localizan en la SNc con algunas neuronas que se extienden a la SNr y SNl. En el VTA se localizan las células A10.



## 1.2. Organización funcional.

### - El estriado y sus aferencias.

#### a) Proyecciones glutamatérgicas estriatales.

El estriado se considera la mayor estructura de salida de los ganglios basales. Además de recibir una inervación dopaminérgica masiva desde el mesencéfalo, también recoge una importante entrada de proyecciones glutamatérgicas excitatorias de la corteza y el tálamo. Y recibe, en menor medida, información del complejo amigdalario y del hipocampo (Wright y cols., 1996). En roedores, el estriado se puede dividir en una parte dorsal (caudado-putamen, Cpu) que procesa principalmente la información sensorial-motora y una parte ventral (núcleo accumbens, NAc) que procesa la información relacionada con la recompensa. En el NAc se pueden definir dos regiones: *core* y *shell* del NAc (Záborszky y cols., 1985). El *core* está más relacionado con las respuestas comportamentales a estímulos condicionados mientras que el *shell* media patrones comportamentales predeterminados en relación a estímulos no condicionados (Meredith y cols., 2008).

#### b) Proyecciones dopaminérgicas estriatales.

En la SNc se localizan las neuronas nigrales A9, que proyectan exclusivamente al estriado dorsal creando una vía nigroestriatal (vía mesoestriatal). Las neuronas A10 del VTA proyectan a áreas límbicas y corticales a través de las vías mesolímbica y mesocortical. En monos y roedores, la inervación dopaminérgica estriatal no sólo deriva de la SNc sino también de neuronas localizadas en el VTA lateral y células A8. Las neuronas dopaminérgicas del VTA lateral proyectan al núcleo accumbens y a la parte ventromedial del estriado dorsal en roedores, correspondiendo al núcleo caudado en primates. Las neuronas A8 proyectan predominantemente a la parte dorsolateral del estriado. Además, la SNc no sólo contiene neuronas que proyectan al estriado, sino también neuronas que inervan áreas límbicas y corticales.

Por tanto, el estriado es el punto de convergencia de un número importante y complejo de entradas que tienen que ser integradas y procesadas. Las dos entradas principales, glutamato y dopamina, convergen en el estriado para modular la respuesta fisiológica de las MSNs. En concreto, las terminales que contienen glutamato y

dopamina convergen en las MSNs estriatales a nivel de las espinas dendríticas (Pert y cols., 1976; Smith y Bolam, 1990; Smith y cols., 1994).

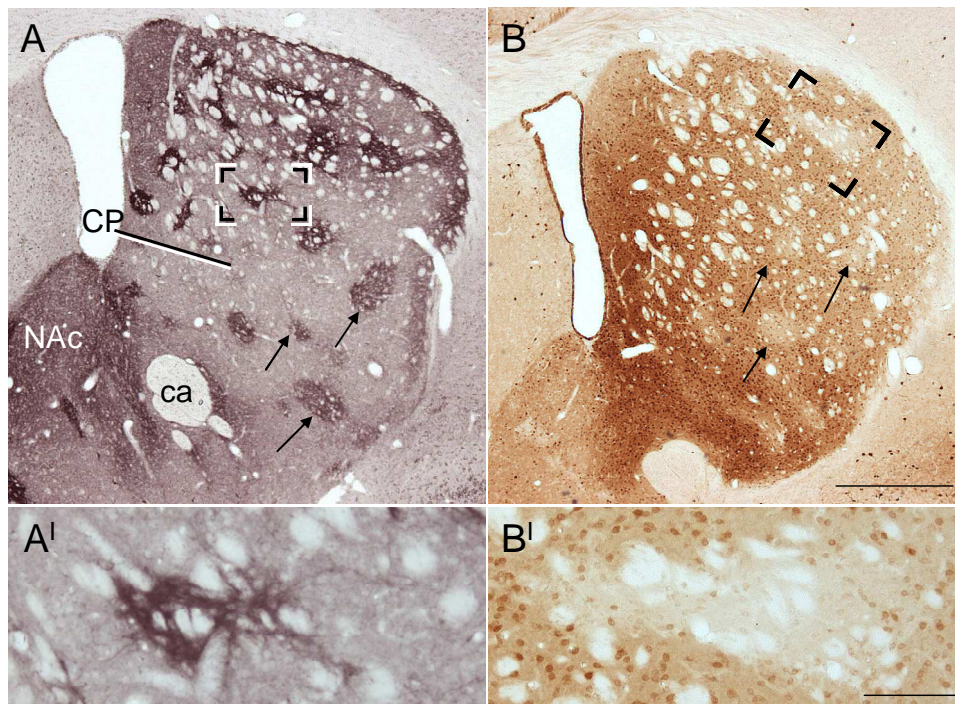
- **Compartimentación interna del estriado. Estriosomas y matriz.**

El estriado se puede dividir en dos compartimentos neuroquímicamente bien definidos: la matriz, que representa aproximadamente del 80-85% del volumen del estriado y los estriosomas, que suponen del 15-20% restante y son grupos celulares inmersos en la matriz y distribuidos de forma dispersa en todo el estriado.

Pert y colaboradores describieron el patrón de distribución de los receptores opioides en cerebro de rata (Pert y cols., 1976) y observaron que los receptores opioides se distribuían de manera heterogénea en el caudado-putamen. Más tarde, Graybiel y Ragsdale (1978) describieron los dos compartimentos del estriado, usando como marcador la distribución de la acetilcolinesterasa, en cerebro humano, de mono y gato. Por sus contribuciones al descubrimiento de los estriosomas y a su implicación en la formación de hábitos la Dra Ann Graybiel recibió el Premio Kavli 2012.

Estos compartimentos vienen definidos por diferencias en la expresión de determinados marcadores neuroquímicos y por las conexiones aferentes y eferentes de estas neuronas estriatales. Los estriosomas se caracterizan por presentar grandes niveles de receptores opiáceos, sustancia P, neurotensina y tirosina hidroxilasa mientras que en la matriz se identifican altos niveles de acetilcolinesterasa, somatostatina, receptores de neurotensina y terminaciones de proyecciones talámicas. También se ha demostrado esta organización compartimental para otras proteínas, como son la proteína ligadora de calcio, calbindina (Gerfen y cols., 1995) y los receptores  $\mu$  opioides (Arvidsson y cols., 1995; Herkenham y Pert, 1981), que se han utilizado como marcadores específicos de la matriz y los estriosomas respectivamente. Otros marcadores neuroquímicos que se organizan de forma diferencial en la matriz y los estriosomas están en estrecha relación con la inervación dopaminérgica, como el transportador de dopamina (Graybiel y Moratalla, 1989) y el receptor de dopamina D<sub>3</sub> (Xu y cols., 1997). Ambos compartimentos reciben entradas diferentes y proyectan a estructuras distintas (Gerfen, 1984, 1985), sugiriendo así distintas funciones fisiológicas. Los estriosomas principalmente reciben y procesan la información relacionada con el sistema límbico y la recompensa (White y Hiroi, 1998) mientras que la matriz recibe la información

relacionada con el sistema motor principalmente (Gerfen, 1984). Se han realizado estudios que demuestran que durante el comportamiento normal existe una actividad metabólica mayor en neuronas de la matriz. Por el contrario, tratamientos crónicos con cocaína y anfetamina en ratas indican que los comportamientos estereotipados activan preferentemente el compartimento estriosomal (Canales y Graybiel, 2000b). Estudios recientes han demostrado que en el estriado de ratones, los estriosomas y la matriz, y las vías mesolímbica y nigroestriatal presentan distinta vulnerabilidad a metanfetamina y MDMA. Además se ha demostrado que la neurotoxicidad a largo plazo inducida por MDMA está principalmente asociada a la pérdida de fibras de dopamina estriosomal (Granado y cols., 2008a; 2010). Esta activación y sensibilidad diferencial de ambos compartimentos a los tratamientos con drogas, podría ser explicado por la mayor proximidad anatómica de los estriosomas a los vasos sanguíneos (Breuer y cols., 2005).

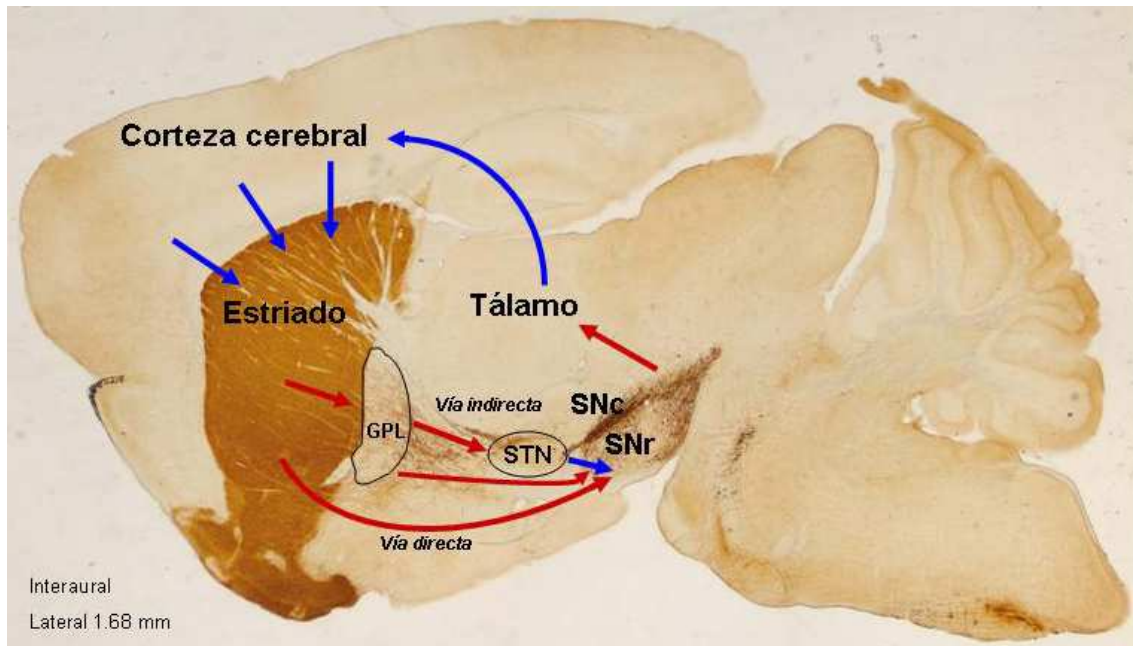


**Figura 1. Ilustración de los dos compartimentos estriatales: estriosomas y matriz.** Microfotografías de secciones transversales de rata que muestran los estriosomas teñidos con un anticuerpo que reconoce el receptor opiáceo  $\mu$  (MOR1) en A y la matriz teñida con un anticuerpo contra calbindina en B. Nótese que ambas tinciones son complementarias, MOR1 marca parches en el estriado y calbindina marca el resto de la masa estriatal, dejando los parches mucho más claros. Barra de calibración = 500  $\mu$ m (A, B) y 100  $\mu$ m (A', B'). Moratalla, 2002. Revista de neurología.

Además, la orientación y trayectoria de la arborización dendrítica y axonal de las MSNs siguen límites compartimentales (Kawaguchi y cols., 1990) sugiriendo una división funcional de las MSNs presentes en ambos compartimentos. Por otro lado, los procesos de interneuronas colinérgicas y GABAérgicas atraviesan estos límites (Chesselet y Graybiel, 1986; Cowan y cols., 1990; Kawaguchi, 1993). En cuanto a los somas de interneuronas colinérgicas y neuropéptido Y, se localizan preferentemente en los límites compartimentales sugiriendo un posible papel de estas interneuronas en la comunicación intercompartimental (Kubota y Kawaguchi, 1993; Saka y cols., 2002; Bernacer y cols., 2007).

- **Vías directa e indirecta del estriado.**

El estriado recibe aferencias glutamatérgicas de la corteza cerebral procedentes de distintas áreas. La información cortical procesada e integrada en el estriado viaja, a través de dos vías paralelas de naturaleza GABAérgica pero con funciones opuestas, hasta las estructuras de salida de los ganglios basales (SNr/GPM) (Alexander y Crutcher, 1990a, 1990b; DeLong, 1990; Smith y cols., 1998). Las neuronas de proyección estriatonigrales, que expresan receptor D<sub>1</sub>, envían sus axones directamente a los núcleos de salida, constituyendo así la llamada **“vía directa o nigroestriatal”**. Estas neuronas nigroestriatales proyectan directamente a las neuronas de SNr/GPM inhibiendo su actividad a través de la liberación de GABA. Por otro lado, en la **“vía indirecta o estriatopalidal”**, las neuronas estriatopalidales, que expresan receptor D<sub>2</sub>, envían proyecciones al GPL que proporciona entradas GABAérgicas al STN. A continuación, el STN actúa sobre la SNr/GPM mediante terminales excitatorios de naturaleza glutamatérgica provocando su activación. Por tanto, la información estriatal proporcionada por la vía indirecta alcanza las estructuras de salida de forma indirecta, a través de dos relevos intermediarios que son el GPL y el STN (Alexander y cols., 1986). Las acciones finales de la vía directa e indirecta son opuestas: la vía directa inhibe las estructuras de salida mientras que la vía indirecta conduce a su activación. Las neuronas de la SNr y el GPM presentan una inhibición continua, ejerciendo así un control inhibitorio fuerte en las dianas de proyección del tálamo motor y otros núcleos talámicos (Deniau y cols., 2007). El tálamo cierra el circuito cortico-ganglios basales-talamocortical enviando proyecciones excitatorias a la corteza motora.



**Figura 2. Conexiones del estriado.** Sección sagital de cerebro de ratón teñida con el anticuerpo tirosina hidroxilasa. Nótese que desde la estructura de entrada (estriado) a la estructura de salida (SNr) la mayoría de las proyecciones son inhibitorias, excepto la proyección glutamatérgica excitatoria que proyecta desde el STN a la SNr. Proyecciones inhibitorias GABAérgicas (flechas rojas) y proyecciones excitatorias glutamatérgicas (flechas azules). Abreviaturas: GPL (Globo pálido lateral), STN (Núcleo subtalámico), SNc (Sustancia negra compacta) y SNr (Sustancia negra reticulada).

Las proyecciones estriatales directas e indirectas regulan la actividad de las estructuras de salida y la actividad tálamo-cortical. La activación de la vía directa origina una inhibición de los núcleos de salida y a la consecuente desinhibición del tálamo motor facilitando así el comportamiento motor. Por el contrario, la estimulación positiva de la vía indirecta permite una activación de las estructuras de salida que inhibirá los núcleos talámicos y como consecuencia se reducirá la respuesta motora. Por tanto, en condiciones fisiológicas normales, las funciones de los ganglios basales resultan del balance entre la vía directa e indirecta que mantiene una actividad talámica normal y así un comportamiento motor adaptado.

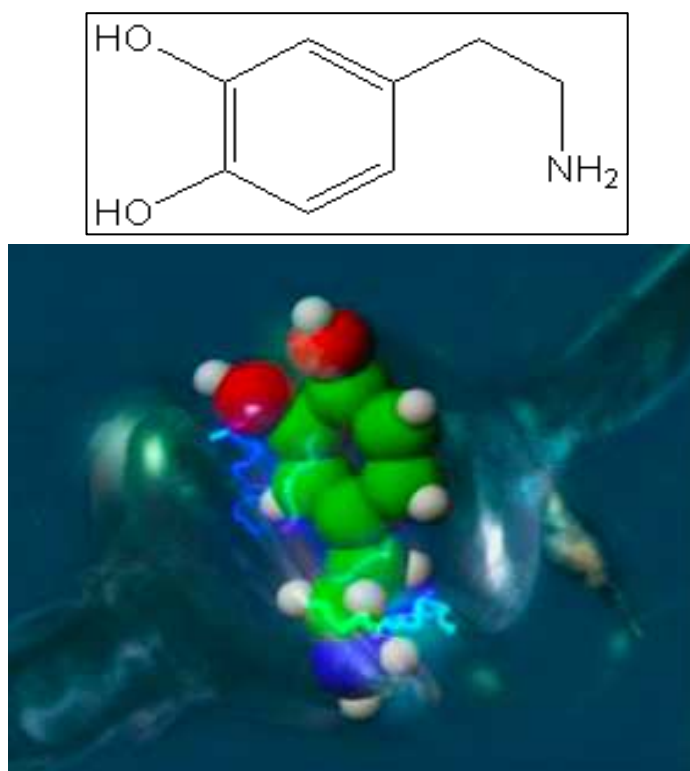
Al circuito cortico-ganglios basales-talamocortical hay que añadirle el papel modulador crítico de la innervación dopaminérgica procedente del mesencéfalo. En los ganglios basales, clásicamente se ha considerado que la dopamina tiene dos acciones opuestas en las neuronas de proyección estriatonigrales y estriatopalidales del estriado.

Por un lado, activa las MSNs estriatonigrales favoreciendo así el movimiento y por otro, inhibe las neuronas estriatopalidales, disminuyendo el movimiento. El resultado de la acción de la dopamina en las neuronas que contienen receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> será una inhibición de las estructuras de salida de los ganglios basales y una facilitación de las respuestas motoras.

En conclusión, la dopamina tiene un papel crucial en el mantenimiento del correcto funcionamiento del circuito de los ganglios basales, como muestran los desórdenes motores encontrados en pacientes parkinsonianos, que son debidos a una degeneración de neuronas dopaminérgicas.

## **2. RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS.**

La dopamina es la principal catecolamina que actúa como neurotransmisor en el Sistema Nervioso Central (SNC), controlando una gran variedad de funciones que incluyen: la modulación de la actividad motora, la actividad sensorial, regulación del sistema endocrino, el aprendizaje, la memoria, la emotividad, afectividad y motivación.



**Figura 3. Estructura molecular y tridimensional de dopamina**

Además, ejerce múltiples funciones a nivel periférico como modulador de la función cardiovascular, liberación de catecolaminas, secreción hormonal, tono vascular, función renal y motilidad gastrointestinal (Missale y cols., 1998). La dopamina ejerce dichas funciones uniéndose a los receptores dopaminérgicos. En los últimos años, la disponibilidad de nuevos compuestos dopaminérgicos y nuevas investigaciones en dicho sistema han dado lugar a más información sobre el papel fisiológico de la dopamina y de los receptores dopaminérgicos, principalmente en el sistema endocrino (Pivonello y cols, 2007).

### **2.1. Clasificación, estructura y expresión de los receptores de dopamina.**

Los receptores dopaminérgicos pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G y presentan siete dominios transmembranales. Se han clonado cinco receptores distintos para la dopamina (Gingrich y Caron, 1993; O'Dowd, 1993) que se dividen en dos subfamilias en función de sus propiedades bioquímicas y farmacológicas: la familia de receptores *D<sub>1</sub>-like*, compuesta por los subtipos *D<sub>1</sub>R* y *D<sub>5</sub>R*, que aumentan el AMPc a través de proteínas *G<sub>s/olf</sub>* y que estimulan la actividad del enzima adenilato ciclasa (AC) localizándose principalmente en los terminales postsinápticos (Civelli y cols, 1993; Alcacer y cols., 2012) y la familia de receptores *D<sub>2</sub>-like*, compuesta por los subtipos *D<sub>2</sub>R*, *D<sub>3</sub>R* y *D<sub>4</sub>R*, que inhiben la AC por acoplamiento a proteínas *G<sub>s/olf</sub>* (Missale y cols, 1998), además de activar canales de  $K^+$  y disminuir la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de canales dependientes de voltaje. La familia de receptores *D<sub>2</sub>* pueden localizarse en terminales presinápticos y postsinápticos (Bunzow y cols, 1988; Sunahara y cols, 1990; Civelli y cols, 1993).

Estructuralmente, los dos subgrupos presentan entre sí una homología aproximada del 50% en los dominios transmembrana, lo que lleva a suponer que provienen del mismo gen ancestral, pero con dos mecanismos evolutivos diferentes. Los receptores de dopamina derivan por divergencia en dos familias de genes que se diferencian principalmente por la presencia o no de intrones. Los genes correspondientes a la familia de receptores *D<sub>1</sub>* no contienen intrones (Gingrich y Caron, 1993), sin embargo, los genes que codifican para la familia de receptores *D<sub>2</sub>* contienen intrones en la región codificadora, permitiendo la generación de *splice variants*. De hecho, el receptor *D<sub>2</sub>* presenta dos isoformas, *D<sub>2S</sub>R* (short) y *D<sub>2L</sub>R* (long) que se generan por *splicing*. Así, las diferencias más importantes son, por un lado, la carencia de

intrones en los genes que codifican los receptores de la familia D<sub>1</sub>, frente a la relativa abundancia de los mismos en los genes que codifican para la familia D<sub>2</sub> y por otro, que el terminal carboxilo es aproximadamente siete veces más largo en la familia D<sub>1</sub> que en la familia D<sub>2</sub>, mientras que el extremo aminoterminal, que contiene varios sitios de glicosilación, tiene un número similar de aminoácidos en todos los receptores. Existen también diferencias en el tercer lazo intracitoplasmático, siendo más corto en la familia de los receptores D<sub>1</sub> que en la familia de los receptores D<sub>2</sub>. En ambas familias de receptores, el extremo carboxi terminal, contiene lugares de fosforilación y palmitoilación que parecen jugar un papel importante en la desensibilización del receptor y en la formación de un cuarto bucle intracelular, respectivamente.

Los receptores dopaminérgicos pueden ser presinápticos o postsinápticos. Los receptores presinápticos o autorreceptores constituyen uno de los principales mecanismos responsables de la regulación de la transmisión dopaminérgica. Así, cuando la dopamina liberada al espacio sináptico estimula los autorreceptores de las regiones somatodendríticas se produce una reducción de la actividad espontánea de la neurona, mientras que la estimulación de los autorreceptores presentes en las terminaciones nerviosas se traduce en una inhibición de la liberación de dopamina. Ambos procesos, son consecuencia de la apertura de canales de potasio. Los receptores presinápticos pertenecen a la familia de receptores D<sub>2</sub> y son más sensibles al efecto de la dopamina que los receptores postsinápticos (Elsworth y Roth, 1997). Los receptores postsinápticos son los responsables de la acción biológica de la dopamina. Además, los cinco tipos de receptores dopaminérgicos tienen localización postsináptica.

## **2.2. Localización de los receptores dopaminérgicos.**

La expresión de los distintos subtipos de receptores ha sido determinada mediante la combinación de técnicas de unión de radioligandos y de hibridación *in situ*. A nivel cerebral, se ha demostrado que el receptor D<sub>1</sub> es el más abundante y su distribución es la más amplia de todos los receptores dopaminérgicos.

La mayor densidad de receptores D<sub>1</sub> se encuentra en las áreas donde termina la vía nigroestriatal y mesolímbica; es decir, en el estriado, núcleo accumbens y tubérculo olfatorio y, en menor medida, en hipotálamo, tálamo y corteza prefrontal (Fremeau Jr. y cols., 1991; Weiner y cols., 1991). Además, la amígdala presenta una densidad muy



elevada del receptor D<sub>1</sub> (Weiner y cols., 1991; Meador-Woodruff, 1994). Existen datos farmacológicos que implican al receptor D<sub>1</sub> en la regulación de la actividad locomotora (Xu y cols., 1994; Moratalla y cols., 1996b; Rodrigues y cols., 2007) y en procesos cognitivos que incluyen aprendizaje y memoria (El-Ghundi y cols., 1999; Granado y cols., 2008b; Ortiz y cols., 2010), además también están implicados en los cambios moleculares que provocan algunas drogas de abuso (Moratalla y cols., 1996b; Ares-Santos y cols., 2012). Los receptores D<sub>5</sub> presentan una distribución más restringida a regiones tales como hipocampo, hipotálamo y núcleos del tálamo, y su densidad es escasa en estriado y neocórtex (Khan y cols., 2000; Rivera y cols., 2002b). Tanto el receptor D<sub>1</sub> como el receptor D<sub>5</sub> se localizan preferentemente de forma postsináptica y la función de este último aún no está muy clara.

En la familia de receptores D<sub>2</sub>, el receptor que presenta mayor densidad en cerebro es el receptor D<sub>2</sub>, que se expresa principalmente en los lugares donde proyectan las vías nigroestriatal y mesolímbica, y en menor medida en la corteza cerebral y en la hipófisis, tanto presináptica como postsinápticamente. El receptor D<sub>2</sub> presináptico actúa como un autorreceptor e inhibe la liberación de dopamina. Los receptores D<sub>2</sub> representan la principal diana de drogas antipsicóticas, además de estar implicados en enfermedades como el Parkinson y el síndrome de Tourette y en la adicción a drogas. El receptor D<sub>2</sub> también se localiza en la glándula pituitaria, regulando así la liberación de hormonas, como la prolactina (Vallone y cols., 2000). En el SNC existe una elevada densidad de este receptor en el caudado-putamen o estriado dorsal, que es la región responsable del control motor, expresándose en neuronas GABAérgicas estriatopallidales que coexpresan encefalina. También presentan una elevada expresión en el hipocampo, las islas de Calleja y el núcleo acumbens o estriado ventral, que es la región responsable de los fenómenos de recompensa asociados a la adicción a drogas. De forma moderada se detecta en la sustancia negra, corteza cerebral, globo pálido, núcleo subtalámico, amígdala, tálamo e hipotálamo (Jackson y cols., 1994). Este receptor está implicado también en los efectos de las drogas de abuso (Granado y cols., 2011).

El receptor D<sub>3</sub> se localiza específicamente en el núcleo acumbens, con una localización postsináptica en neuronas que expresan sustancia P y neurotensina. Estos

receptores se localizan también en las Islas de Calleja (Xu y cols, 1997; Diaz y cols., 2000).

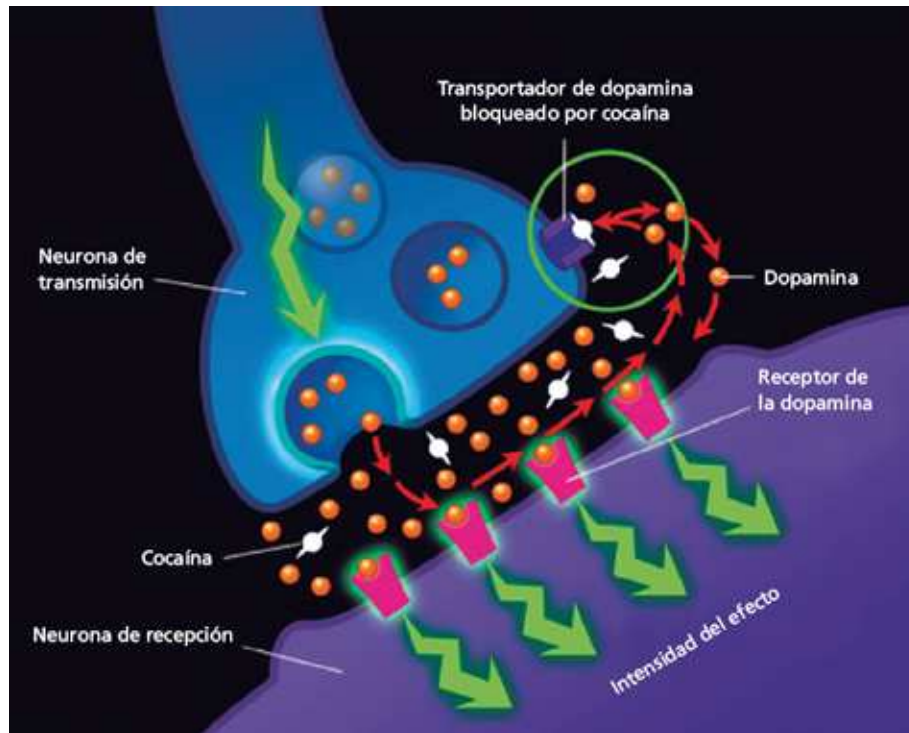
El receptor D<sub>4</sub> se expresa en interneuronas GABAérgicas de la corteza y sistema límbico y su presencia en estriado es muy baja (Rivera y cols., 2002a). La función de los receptores D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub> aún no está muy establecida pero su localización en áreas límbicas sugiere que tienen un papel importante en funciones cognitivas, emocionales y en el sistema de recompensa (Martin y cols., 2000).

### **3. SISTEMA DOPAMINÉRGICO Y PSICOESTIMULANTES.**

Los psicoestimulantes son sustancias capaces de reducir el umbral de alerta o de vigilia, de modo que el individuo responde con más facilidad o prontitud a los estímulos exógenos o endógenos. Hay diversos tipos de psicoestimulantes que se clasifican en tres grandes familias: anfetamínicos, alcaloides naturales y metilxantinas.

La anfetamina y la cocaína son dos psicoestimulantes que producen una potente estimulación motora. Cuando se administran de forma crónica producen cambios prolongados en el comportamiento, sensibilización conductual y adicción presentando un alto potencial de abuso y dependencia. Además, se desarrolla tolerancia, disminuyendo de forma progresiva los efectos de la droga.

La **anfetamina** es una fenilisopropilamina cuyos efectos estimulantes se deben a aumento de dopamina en la sinapsis, tanto por bloqueo de la recaptación como por aumento de la liberación. También aumenta la concentración de noradrenalina y de serotonina de manera similar a la dopamina (Seiden y cols, 1993). La **cocaína** es un agonista dopaminérgico indirecto que se une al transportador de dopamina (DAT) bloqueándolo y, en consecuencia, dando lugar a un gran aumento en la concentración de dopamina en la hendidura sináptica (Fig 4). Dicha estimulación dopaminérgica es la responsable de la mayoría de los efectos reforzadores de la cocaína y de los efectos sobre la activación motora. La cocaína también bloquea la recaptación de otras monoaminas como la serotonina y la noradrenalina.



**Figura 4. Mecanismo de acción de los psicoestimulantes anfetamina y cocaína.** Ambos aumentan la disponibilidad de dopamina (DA) y otras aminas biógenas en la hendidura sináptica. La anfetamina estimula la exocitosis y liberación de dopamina (además de noradrenalina y serotonina) desde la mayoría de las regiones cerebrales, e induce que el transportador de dopamina (DAT) actúe de modo inverso. La cocaína bloquea la recaptación de dopamina y otras aminas inactivando el transportador de aminas e inhibiendo su actividad. La dopamina actúa sobre receptores de la familia D<sub>1</sub> (activan la adenilciclase, AC) o D<sub>2</sub> (inhiben la AC).

El sistema dopaminérgico es el principal sustrato neuronal de los efectos reforzadores de la conducta adictiva inducida por cocaína y la mayoría de drogas de abuso. La vía mesocorticolímbica representa el sustrato anatómico de las respuestas motoras y reforzadoras de la cocaína. Esta vía neural está compuesta por las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral (ATV) que proyectan fundamentalmente al núcleo accumbens, el tubérculo olfatorio y a las cortezas prefrontal y cingular (Nestler, 2004).

### 3.1. Respuesta conductual a la exposición de psicoestimulantes.

En roedores, la administración aguda de psicoestimulantes incrementa de manera consistente la actividad motora. A dosis bajas, se produce un incremento en la actividad horizontal, alzamientos, acicalamientos y actividad exploratoria, mediada principalmente por el sistema mesolímbico (Wise, 1996) y a dosis más altas, se produce

un incremento en la conducta estereotipada mediada principalmente por el sistema nigroestriatal. Con la administración crónica se observa un aumento en la respuesta motora que se llama **sensibilización conductual** (Robinson y Berridge, 1993). Dicha sensibilización consiste en un aumento progresivo de la respuesta conductual (aumento de la locomoción y la estereotipia) producida por dosis repetidas de psicoestimulantes y debida a una hiperfunción dopaminérgica corticolímbica. Una de las alteraciones asociada a la sensibilización conductual inducida por cocaína y otros psicoestimulantes, es un aumento en la capacidad de producir una potenciación en la liberación de dopamina en el estriado dorsal y ventral que, a su vez, aumenta la actividad de la adenilato ciclasa y de la proteína kinasa A (Vallone y cols., 1997; Moratalla y cols., 1996a). Se ha demostrado en estudios clínicos, que en animales previamente sensibilizados hay un incremento en la autoadministración de psicoestimulantes. Por tanto, la sensibilización conductual parece ser necesaria para el desarrollo de adicción a psicoestimulantes (Hiroi y whitey, 1991).

### **3.2. Respuesta molecular a la exposición de psicoestimulantes: inducción de genes de expresión temprana o factores de transcripción.**

Desde el punto de vista neurobiológico, la cocaína y la anfetamina producen cambios en el SNC a corto y a largo plazo, que están implicados en los procesos de adicción. La cocaína, al estimular indirectamente los receptores dopaminérgicos, activa la vía dependiente del adenosín monofosfato cíclico (AMPC) y estimula la proteína kinasa A, que a su vez produce la fosforilación de varias proteínas, entre las que se encuentran el CREB y ERK (del inglés, *extracellular regulated kinase*) (Bertran-Gonzalez y cols., 2008). Dichas proteínas inducen la expresión de diversos factores de transcripción en el núcleo de las neuronas activadas por cocaína, que se localizan en la corteza y fundamentalmente en el estriado dorsal (caudado-putamen) y en el estriado ventral o núcleo accumbens.

Varios estudios realizados a principios de los noventa demostraron que la administración aguda de cocaína o anfetamina inducía la expresión estriatal de genes de expresión temprana o genes inmediatos (IEG), como c-Fos, Fos B, Jun B, NGFI-A entre otros (Graybiel y cols., 1990; Moratalla y cols., 1992, 1993). La expresión de estos genes se correlaciona con los efectos conductuales producidos por cocaína, ya que el

bloqueo de su expresión inhibe también la respuesta conductual inducida por cocaína (Xu y cols, 1994; Moratalla y cols, 1996a, 1996b; Drago y cols, 1996).

La administración crónica de cocaína induce de forma selectiva la expresión de Fos B truncado ( $\Delta$ FosB) en las neuronas del núcleo accumbens, cuyos niveles se acumulan durante el tratamiento crónico y permanecen elevados durante mucho tiempo después. Por tanto, el  $\Delta$ FosB es responsable de la mayoría de los cambios a largo plazo en la expresión génica implicados en la adicción (Chen y cols., 1995).

### **3.3. Fenotipo molecular de las neuronas que responden al tratamiento con cocaína.**

Los factores de transcripción se utilizan también como marcadores de la actividad celular. La cocaína activa fundamentalmente las neuronas estriatonigrales, ya que la expresión de c-Fos y  $\Delta$ FosB inducida por cocaína tiene lugar en estas neuronas, cuyo marcador específico es el neuropéptido dinorfina y el receptor dopaminérgico D<sub>1</sub> (Moratalla y cols., 1996a). Las neuronas estriatopalidales no expresan estos factores de transcripción inducidos por cocaína.

La expresión de los factores de transcripción es bastante homogénea y se produce con igual intensidad en los estriosomas y en la matriz. Sin embargo, después de una exposición repetida a cocaína, una dosis más de cocaína, produce un cambio en el patrón de expresión génica, en concreto, en la parte rostral del estriado donde se observa mayor expresión de  $\Delta$ FosB en los estriosomas que en la matriz (Moratalla y cols., 1996a; Vanderschuren y cols., 2002). Estos resultados son interesantes porque los compartimentos estriatales median acciones distintas del estriado, la matriz es la parte motora y los estriosomas la parte límbica. Por tanto, el diferente patrón de expresión génica inducido por los tratamientos agudo y crónico de cocaína refleja su diferente respuesta comportamental.

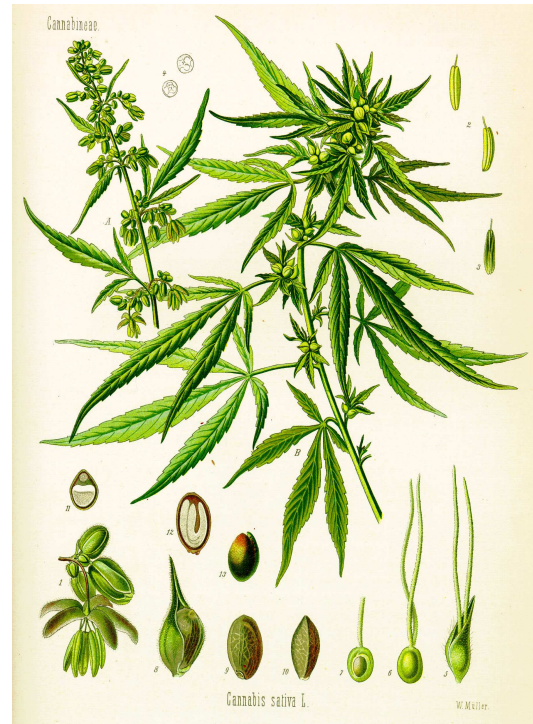
### **3.4. Receptores dopaminérgicos implicados en las acciones de los psicoestimulantes.**

El receptor dopaminérgico D<sub>1</sub> fue el primer receptor que se involucró en las acciones de la cocaína. El estudio en ratones genéticamente modificados D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>, ha demostrado que el receptor D<sub>1</sub> tiene un papel primordial en las acciones de la cocaína (Xu y cols., 1994; Centonze y cols., 2003). La inactivación del receptor inhibe la respuesta conductual al tratamiento agudo con cocaína o anfetamina, bloqueando la actividad motora, la conducta estereotipada y la inducción de sensibilización motora tras el tratamiento crónico. Además, bloqueó la expresión de los factores de transcripción c-Fos, ΔFosB y Jun B inducida por psicoestimulantes. Estudios recientes sugieren que el c-Fos regula intracelularmente la alteración inducida por cocaína en la expresión de genes, la reorganización de los circuitos neuronales y el desarrollo y manifestación de sensibilización conductual. Dichos estudios presentan conclusiones que sugieren que el c-Fos, expresado en neuronas que contienen el receptor D<sub>1</sub>, media los cambios persistentes inducidos por cocaína (Zhang y cols., 2002; Xu, 2008; Bertran-González y col., 2008). Otros estudios demuestran que el receptor D<sub>1</sub>, pero no el receptor D<sub>2</sub>, juega un papel crítico en la regulación de la expresión de genes inducidos por cocaína en el estriado y que la vía de ERK puede contribuir a esta regulación (Guan y cols., 2009). Estudios recientes han demostrado que la inactivación del receptor D<sub>2</sub> o la del D<sub>1</sub> previene la neurotoxicidad inducida por metanfetamina (Granado y cols., 2011; Ares-Santos y cols., 2012).

## **4. SISTEMA CANNABINOIDE.**

Los cannabinoides constituyen un conjunto de compuestos psicoactivos presentes en una resina secretada a partir de las hojas y brotes florecidos de la planta *Cannabis sativa* (Fig 5). El consumo de dichos compuestos como sustancias psicotropas es muy antiguo. Antiguamente su uso estaba muy extendido en culturas del norte de África y de Oriente Medio, dónde su consumo buscaba propiedades curativas pero siempre asociadas a aspectos sociales y religiosos. En el siglo XIX, se prescribía ampliamente en el mundo occidental para varias dolencias y malestares. Actualmente, el consumo de cannabis está ampliamente extendido por todo el mundo convirtiéndose en la droga ilegal más consumida.

La planta *Cannabis sativa* contiene aproximadamente 400 compuestos químicos diferentes de los que unos 60 se consideran dentro del grupo de los cannabinoides (Dewey, 1986). En la década de los sesenta, Gaoni y Mechoulam aislaron e identificaron el  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC), principal componente psicoactivo del *Cannabis sativa* (Gaoni y Mechoulam, 1964). Este descubrimiento abrió las puertas a la investigación científica de las propiedades biológicas y médicas del cannabis y sirvió para el desarrollo de derivados con capacidad terapéutica, en los que se trató de separar las propiedades farmacológicas de los efectos psicoactivos.



**Figura 5.** *Cannabis sativa* (tomado de [www.mpiz-koeln.mpg.de/.../koehler/](http://www.mpiz-koeln.mpg.de/.../koehler/))

Los cannabinoides son compuestos muy lipofílicos, de forma que durante mucho tiempo se pensó que estos compuestos ejercían sus efectos mediante interacciones inespecíficas con lípidos de membrana. Con esta teoría sólo se podía justificar una pequeña parte de los efectos producidos por estos compuestos. Así, a partir de los datos farmacológicos, comenzó a evaluarse la posibilidad de que el  $\Delta^9$ -THC pudiera ejercer sus efectos específicos a través de la unión con un receptor proteico.

Se desarrollaron estudios de relación estructura-actividad que sugirieron que algunos mecanismos mediados por receptor eran los responsables de los efectos ejercidos por los cannabinoides. Entre ellos, el desarrollo del ligando sintético CP-55,940 permitió demostrar su capacidad de unión a receptores específicos en membranas de cerebro de rata (Devane y cols., 1988). En 1990, Matsuda y colaboradores clonaron el primer receptor cannabinoide, el receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>, que está densamente expresado en el SNC (Matsuda y cols., 1990). Poco después,

Munro y colaboradores clonaron el receptor cannabinoide CB<sub>2</sub> (Munro y cols., 1993), en un principio descrito fundamentalmente en el sistema inmunitario (Pertwee, 1997), pero actualmente mediante técnicas de inmunohistoquímica o de hibridación *in situ* se ha descrito también en diversas áreas del SNC (corteza, hipocampo, estriado, sustancia negra, cerebelo, entre otras) (Onaivi y cols., 2008). Diversas evidencias farmacológicas sugieren la existencia de un tercer tipo de receptor cannabinoide llamado CB<sub>3</sub> o CB<sub>x</sub> que no ha sido clonado aún (Fride y cols., 2003).

En los últimos años existen evidencias que demuestran que algunos ligandos cannabinoides clásicos son capaces de interaccionar con otros tipos de receptores como el receptor ionotrópico “transient receptor potencial vanilloid 1” (TRPV<sub>1</sub>) (Begg y cols., 2005), receptores huérfanos de receptores acoplados a proteínas G, como el “G protein-coupled receptor 55” (GPR55) y “G protein-coupled receptor 119” (GPR119) (Pertwee, 2007; Brown, 2007) o el receptor nuclear PPAR-gamma (Burstein, 2005).

La identificación, caracterización farmacológica y localización de receptores específicos de membrana que mediaban los efectos centrales y periféricos de los cannabinoides, originó la búsqueda de ligandos endógenos para estos receptores. El primer endocannabinoide aislado fue la anandamida (Devane y cols., 1992) y posteriormente se aisló el 2-araquidonil glicerol (Mechoulam y cols., 1995; Sugiura y cols., 1995). Por tanto, existe una clara evidencia de la existencia de un sistema cannabinoide endógeno que ha proporcionado nuevas perspectivas de investigación. El sistema cannabinoide endógeno está implicado en distintas funciones, como la coordinación motora, el aprendizaje y la memoria, la antinocicepción, el control de las emociones, el desarrollo neuronal y también en la mediación de diferentes procesos a nivel cardiovascular e inmunológico.

#### **4.1. Distribución anatómica de los receptores cannabinoides.**

El receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> se localiza fundamentalmente en el SNC (Howlett y cols., 2002). Mediante diferentes técnicas autorradiográficas y estudios inmunohistoquímicos se ha descrito, de forma detallada, la presencia y distribución del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> en el cerebro de rata y en el ser humano (Herkenham y cols., 1990, 1991 a, b; Mailleux y Vanderhaeghen, 1992; Tsou y cols., 1998; Westlake y cols., 1994; Martín y cols., 2008). Dicho receptor se expresa de forma abundante en distintas estructuras del encéfalo.



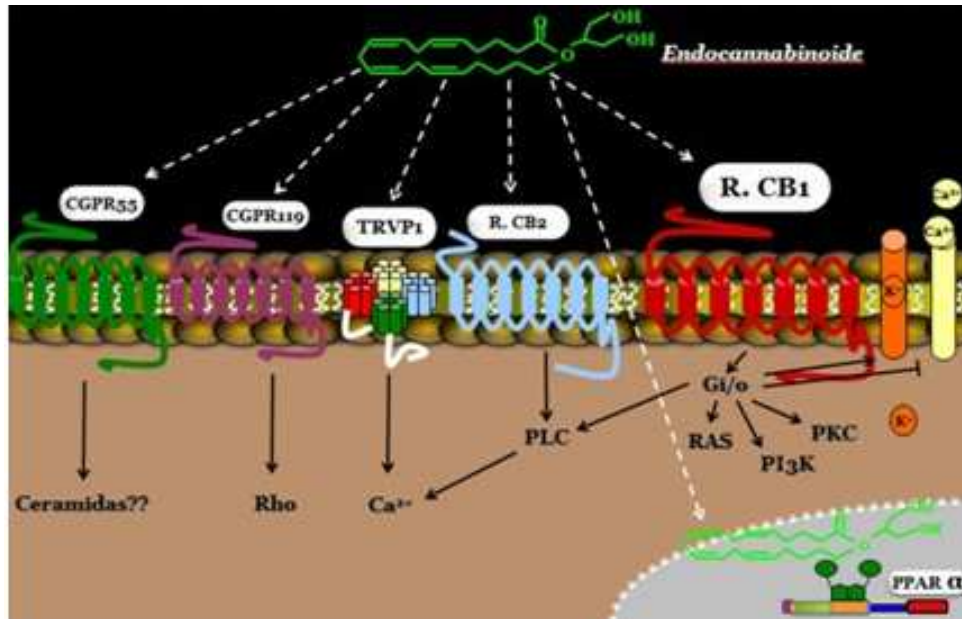
La mayor densidad de receptores cannabinoides CB<sub>1</sub> cerebrales se observa en los ganglios basales (caudado-putamen, globo pálido, núcleo entopeduncular y sustancia negra *pars reticulata*). Además, dicho receptor se ha localizado en otras regiones del encéfalo como la capa molecular del cerebelo e hipocampo, la corteza límbica, la extensión de la amígdala, y en núcleos del hipotálamo como el hipotálamo lateral, el núcleo ventromedial y paraventricular donde se observan niveles bajos (Breivogel y cols., 1997; Herkenham y cols., 1990, 1991b; Sim y cols., 1996). Otras áreas que presentan niveles más moderados de receptores CB<sub>1</sub>, pero que destacan por su importancia funcional, son el núcleo accumbens, la corteza cerebral y el asta dorsal de la médula espinal (Herkenham y cols., 1991b; Mailleux y Vanderhaeghen, 1992; Pettit y cols., 1998). Además de su localización en el SNC, los receptores CB<sub>1</sub> se encuentran presentes en tejidos periféricos, como son el bazo, pulmón, corazón, testículos, próstata, endotelio vascular, sistema inmune, músculo liso, adipocitos y todos los tejidos implicados en el control del metabolismo (Galiegue y cols., 1995; Pertwee, 2001; Pertwee y cols., 2010). Los receptores CB<sub>1</sub> se localizan principalmente en las terminales presinápticas donde modulan la liberación de neurotransmisores excitadores e inhibidores, generalmente inhibiendo su liberación (Alger, 2002; Vaughan y Christie, 2005; Szabo y Schlicker, 2005). En las terminales glutamatérgicas, los receptores CB<sub>1</sub> median la neuroprotección frente a la excitotoxicidad (Monory y cols., 2006) y son responsables de los efectos del  $\Delta^9$ -THC en la locomoción, hipotermia, analgesia y catalepsia (Monory y cols., 2007). Por otro lado, los receptores CB<sub>1</sub> expresados en las terminales GABAérgicas son críticos para los déficits de memoria inducidos por  $\Delta^9$ -THC (Puighermanal y cols., 2009), para el estrés y los mecanismos de recompensa naturales (Rossi y cols., 2008; De Chiara y cols., 2010). El control de los receptores CB<sub>1</sub> sobre la liberación de neurotransmisores potencia el importante papel de estos receptores en la ansiedad, depresión, cognición, adicción, funciones motoras, ingesta y dolor (Kano y cols., 2009).

El receptor cannabinoide CB<sub>2</sub> se localiza principalmente a nivel periférico, en el bazo, amígdalas y en distintas células del sistema inmunitario como macrófagos, neutrófilos, monocitos, células “natural Killer” y especialmente en los linfocitos B (Munro y cols., 1993; Galiegue y cols., 1995; Schatz y cols., 1997). La presencia en estos tejidos y células parece estar relacionada con las propiedades inmunosupresoras de los cannabinoides (Klein y cols., 1998, 2001). Pero también existen algunas evidencias

de la existencia a nivel central de receptores CB<sub>2</sub>, así se ha descrito su presencia en células de tumor glial (Sánchez y cols., 2001) y en la microglía (Walter y cols., 2003; Nuñez y cols., 2004). Parece ser que el receptor CB<sub>2</sub> no se localiza en neuronas, aunque un estudio ha descrito la presencia del ARN mensajero (ARNm) que codifica este receptor en cultivos de células de Purkinje y células granulares de cerebelo de ratón (Skaper y cols., 1996) y en neuronas del tronco cerebral (Van Sickle y cols., 2005). El papel funcional de los receptores CB<sub>2</sub> aún no está muy claro (Van Sickle y cols., 2005; Atwood y Mackie, 2010) pero se ha demostrado que su expresión en microglía activada modularía las respuestas neuroinflamatorias (Racz y cols., 2008; Stella, 2010; Atwood y Mackie, 2010).

#### **4.2. Mecanismos de transducción de señal asociados a los receptores cannabinoides.**

Los receptores cannabinoides se unen principalmente a proteínas G de tipo inhibitorio o G<sub>i/o</sub> dando lugar a un cambio en la actividad de diferentes rutas o vías de señalización intracelular. La activación de los receptores CB<sub>1</sub> produce una inhibición de la vía de la adenilato ciclasa, regulación de distintos canales iónicos y activación de la ruta de las MAP quinasas (Mackie y Hille, 1992; Bouaboula y cols., 1995; Felder y cols., 1995; Mackie y cols., 1995; Howlett, 1998; Derkinderen y cols., 2001). La inhibición de la vía de la adenilato ciclasa disminuye los niveles de AMPc intracelular, variando así la capacidad de fosforilación de las proteínas quinasas dependientes de AMPc. La activación de los receptores CB<sub>1</sub> induce una inhibición de los canales de calcio y un aumento en la conductancia de potasio (Howlett, 2005). Este mecanismo podría ser el responsable del efecto inhibitorio de los cannabinoides sobre la liberación de neurotransmisores. También participan en la activación de la ruta de las MAP quinasas, vía que está implicada en la regulación de fenómenos de proliferación y diferenciación celular.



**Figura 6. Receptores cannabinoides y sus respectivas vías de señalización.** La activación de los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> dan lugar a una inhibición de la vía de la adenilato ciclasa y la activación de la ruta de las MAP quinasas pero solamente los receptores CB<sub>1</sub> regulan diferentes canales iónicos.

Al igual que los receptores CB<sub>1</sub>, los receptores CB<sub>2</sub> producen una inhibición de la adenilato ciclasa y una activación de la vía de las MAP quinasas, pero no producen modificaciones en la regulación de los canales iónicos (Felder y cols., 1995). Además, promueve la inhibición de la óxido nítrico sintasa (Maccarrone y cols., 2007).

#### 4.3. Endocannabinoides.

La identificación de los receptores cannabinoides originó la búsqueda de sustancias endógenas capaces de activar dichos receptores en condiciones fisiológicas. Los ligandos endógenos de los receptores para cannabinoides son compuestos de naturaleza lipídica derivados de ácidos grasos poliinsaturados. La primera sustancia endógena identificada como agonista de los receptores cannabinoides fue la N-araquidonil etanolamina o anandamida (Devane y cols., 1992). La anandamida induce la inhibición de la adenilato ciclasa al igual que el  $\Delta^9$ -THC (Howlett y cols., 1988) y su administración da lugar a los efectos clásicos de la actividad cannabinoide: catalepsia, inmovilidad, analgesia e hipotermia (Devane y cols., 1992; Crawley y cols., 1993; Fride y Mechoulam, 1993; Vogel y cols., 1993; Smith y cols., 1994). La anandamida actúa como un agonista parcial de los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> (Sugiura y cols., 2002). El

segundo endocannabinoide identificado fue el 2-araquidonil glicerol (2-AG) (Mechoulam y cols., 1995; Sugiura y cols., 1995) que actúa como un agonista completo de los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> (Sugiura y cols., 2006). Además también se han encontrado otros endocannabinoides como la palmitoil etanolamida (Sugiura y cols., 2000), 2-araquidonil glicerol eter (Hanus y cols., 2001), oleiletanolamida (OEA) (Rodríguez-Fonseca y cols., 2001), N-araquidonil dopamina (Huang y cols., 2002) y O-araquidonil etanolamida (Porter y cols., 2002) aunque su relevancia fisiológica está aún en estudio.

Los endocannabinoides se sintetizan en las neuronas, son liberados en el espacio sináptico donde activan receptores de membrana y finalmente inactivados por recaptación y degradación enzimática. Sin embargo, los endocannabinoides se diferencian con respecto a los neurotransmisores clásicos en que no se almacenan en vesículas sinápticas. Por tanto, los endocannabinoides son mediadores que se sintetizan según demanda (Di Marzo y cols., 1994), actúan en las proximidades del lugar dónde se han liberado y son rápidamente inactivados (Piomelli, 2003). Por otro lado, los endocannabinoides actúan como mensajeros retrógrados en el SNC (Wilson y Nicoll, 2002) comportándose como neuromoduladores en una gran variedad de procesos fisiológicos. La aplicación de estímulos concretos provoca la liberación de endocannabinoides desde las neuronas postsinápticas, estimulando así a los receptores CB<sub>1</sub> presinápticos que inhibirían la liberación de diferentes neurotransmisores (Alger, 2002).

Los endocannabinoides anandamida y 2-AG, y su enzima de síntesis la diacilglicerol-lipasa (Bisogno y cols., 1999; Felder y cols., 1996; Suarez y cols., 2011), se han encontrado en el cerebro, en áreas donde hay una mayor densidad de receptores cannabinoides CB<sub>1</sub>, como el estriado, la corteza y el hipocampo. En el cerebro, las concentraciones de anandamida son bajas, sin embargo, las concentraciones de 2-AG son mucho mayores, llegando a ser unas 200 veces superiores a las de anandamida (Stella y cols., 1997).

#### **4.4. Funcionalidad del sistema cannabinoide endógeno.**

Se han realizado multitud de estudios sobre la actividad farmacológica de los cannabinoides, tanto endógenos como los obtenidos a partir de la *Cannabis Sativa* y los cannabinoides sintéticos. Sin embargo, el papel fisiológico del sistema cannabinoide endógeno aún no está totalmente esclarecido.

Los efectos conductuales más destacables producidos por los cannabinoides son los recogidos en un patrón de comportamiento conocido como la “tétrada cannabinoide clásica”. Este patrón está compuesto por cuatro efectos principales producidos por la administración aguda de cannabinoides, que son: analgesia, hipotermia, inmovilidad y catalepsia (Abood y Martin, 1992; Compton y cols., 1991; Pertwee y Ross, 1991). El sistema endocannabinoide está implicado en la regulación de gran variedad de procesos fisiológicos, como son el control motor, transmisión nociceptiva, temperatura corporal, aprendizaje y memoria, ingesta, el control de las emociones, motivación, tolerancia y dependencia, en neuroprotección, como antiinflamatorios y antioxidantes, además de estar implicados en diferentes procesos a nivel cardiovascular e inmunológico entre otros (Ameri, 1999).

**- Efectos de los cannabinoides sobre el control motor.**

Los estudios en animales indican que los cannabinoides alteran el comportamiento motor y dan lugar a la aparición de ataxia, aumento de las conductas de inmovilidad, disminución de la actividad motora espontánea o catalepsia (Pertwee y cols., 1988; Pertwee y Ross, 1991; Pertwee y Wickens, 1991; Romero y cols., 1996; Rodríguez de Fonseca y cols., 1997; Sañudo-Peña y cols., 2000). El sistema cannabinoide endógeno actúa como modulador de los procesos de neurotransmisión implicados en la regulación y control del comportamiento motor, a nivel de los ganglios basales, del sistema límbico y del cerebelo (Morera-Herreras y cols., 2012; Fernandez-Ruiz y cols., 2002; Giuffrida y Piomelli, 2000; Glass y cols., 1997; Rodríguez de Fonseca y cols., 1998).

La implicación del sistema endocannabinoide en la funcionalidad de los ganglios basales está determinada por los siguientes fenómenos:

- Los cannabinoides producen importantes cambios en la regulación del comportamiento motor, como son inmovilidad o alteración de la actividad motora espontánea (Rodríguez de Fonseca y cols., 1997, 1998; Fernández-Ruiz y cols., 2002; Martin y cols, 2008).

- Los efectos motores de los cannabinoides parecen correlacionarse con la distribución neuroanatómica del receptor CB<sub>1</sub>. La elevada densidad de receptores CB<sub>1</sub> en las zonas cerebrales que se encuentran estrechamente relacionadas con el control

motor como son el estriado, globo pálido, sustancia negra y cerebelo, permite relacionar el sistema cannabinoide endógeno con el control del movimiento (Herkenham y cols., 1990, 1991a; Mailleux y Vanderhaeghen, 1992; Glass y cols., 1997; Tsou y cols., 1998).

Los receptores CB<sub>1</sub> se localizan principalmente en las terminaciones axónicas presinápticas de las neuronas GABAérgicas que proyectan desde el estriado a la SNr y a el globo pálido (Herkenham y cols., 1991a; Westlake y cols, 1994), y en las neuronas glutamatérgicas que proyectan desde los núcleos subtalámicos a la SNr (Glass y cols., 1997; Tsou y cols., 1998). Por tanto, la presencia del receptor CB<sub>1</sub> en las neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas permite que los cannabinoides puedan tener un efecto directo sobre los procesos de liberación y recaptación de estos neurotransmisores (Schlicker y Kathmann, 2001).

A pesar de que los receptores cannabinoides CB<sub>1</sub> no se encuentran expresados en las neuronas dopaminérgicas, estos receptores colocalizan con los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> en las neuronas de proyección GABAérgicas del estriado (vía estriatonigral y estriatopalidal, respectivamente) (Mansour y cols., 1992; Mailleux y Vanderhaeghen, 1993; Hermann y cols., 2002; Julian y cols., 2003). Dichos resultados se han demostrado también en este trabajo (Martin y cols., 2008). Esta colocalización facilita las interacciones postsinápticas entre los endocannabinoides y la dopamina a nivel de transducción de señal de adenilato ciclasa (Giuffrida y cols., 1999; Meschler y cols., 2001).

Por otro lado, el efecto sobre las neuronas dopaminérgicas parece ser indirecto, a través de la modulación de GABA y glutamato y la colocalización con los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> (Fernández-Ruiz y cols., 2002; Rodríguez de Fonseca, 1998; Julian y cols, 2003). Así, los receptores CB<sub>1</sub> se localizan en las terminales presinápticas de las neuronas GABAérgicas estriatopalidales y estriatonigrales y dan lugar a un mecanismo de inhibición indirecta, ya que al activarse dichos receptores bloquean la recaptación de GABA aumentando la acción de dicho neurotransmisor sobre las neuronas dopaminérgicas (Glass y cols., 1997). En relación al GABA los datos son contradictorios, así pueden incrementar la liberación y/o disminuir la recaptación de este neurotransmisor en el globo pálido y la sustancia negra, aumentando su presencia en la sinapsis e incrementando la acción GABAérgica que sería compatible con los efectos

hipoquinéticos de los cannabinoides (Fernández-Ruiz y cols., 2002). A nivel de los ganglios basales los cannabinoides inhiben la liberación del neurotransmisor excitador glutamato, dando lugar así a un efecto depresor en el comportamiento motor (Szabo y cols., 2000; Fernández-Ruiz y cols., 2002). Estudios recientes sugieren que algunos endocannabinoides, como la anandamida, pueden activar directamente los receptores TRPV<sub>1</sub>, los cuales se han encontrado en vías dopaminérgicas, permitiendo así una regulación directa de la función dopaminérgica (Mezey y cols., 2000, Tzavara y cols., 2006).

A través de estos mecanismos directos o indirectos que implican neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas, los cannabinoides pueden interactuar con la transmisión dopaminérgica en el SNC y esto influye de manera importante en varios procesos neurobiológicos relacionados con la dopamina (control del movimiento, motivación /recompensa) y, en particular, sobre diferentes patologías que afectan estos procesos como desórdenes de ganglios basales, esquizofrenia y adicción a drogas (Lee y cols., 2012).

**- Efectos de los cannabinoides en la transmisión nociceptiva.**

Una de las principales funciones fisiológicas atribuida al sistema endocannabinoide es la del control de la nocicepción (Pertwee, 2001; Hohmann y cols., 2002). Los cannabinoides naturales y sintéticos son capaces de producir efectos antinociceptivos en diferentes modelos animales de dolor (Walker y Huang, 2002). Por tanto, los cannabinoides son efectivos en modelos de dolor agudo y en dolores crónicos de naturaleza neuropática e inflamatoria (Campbell y cols., 2001; Guindon y Beaulieu, 2006).

Los receptores cannabinoides se encuentran localizados en estructuras implicadas en la transmisión del estímulo nociceptivo, como el asta dorsal de la médula espinal, el tálamo o la corteza (Tsou y cols., 1998; Walter y Huang, 2002). Además la liberación de endocannabinoides en ciertas áreas cerebrales tras la inducción de estímulos nociceptivos confirmaría la hipótesis anterior (Walker y cols., 1999).

Se postulan cuatro mecanismos de acción mediante los cuales los cannabinoides producen su efecto antinociceptivo:

a) Efectos mediados a través de receptores cannabinoides.

A nivel central, la actividad antinociceptiva de los cannabinoides se debe principalmente a la presencia de receptores CB<sub>1</sub> en la médula espinal y en estructuras supraespinas (Ledent y cols., 1999). A nivel espinal, los receptores CB<sub>1</sub> se localizan principalmente en el asta dorsal de la médula espinal. Se ha demostrado que la administración a ratones del antagonista cannabinoide SR 141716A (rimonabant) produce hiperalgesia, lo que sugiere la existencia de un tono cannabinoide basal, cuya inhibición sería responsable de esta hiperalgesia (Richardson y cols., 1998). Y a nivel periférico, los efectos antinociceptivos parecen estar mediados por la activación de los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> produciendo un efecto sinérgico. La estimulación de los receptores CB<sub>2</sub> inhibe las respuestas dolorosas (Clayton y cols., 2002) por lo que el uso de los agonistas CB<sub>2</sub> puede ser una posibilidad para el tratamiento del dolor sin efectos psicoactivos (Malan y cols., 2003).

b) Efectos mediados a través de receptores TRPV<sub>1</sub>.

Se ha sugerido que los cannabinoides pueden ejercer efectos antinociceptivos al interactuar no sólo con receptores cannabinoides sino también con receptores vanilloides (Pertwee, 2001). Los receptores vanilloides están involucrados en dolores agudos y crónicos tanto a nivel espinal como periférico. La activación de los receptores vanilloides causa dolor (Shin y cols., 2002).

c) Interacción con el sistema opioide.

El sistema endocannabinoide colocaliza frecuentemente con el sistema opioide, que es el sistema endógeno de control del dolor más potente. Ambos coinciden en las estructuras implicadas en la transmisión dolorosa, e incluso el efecto analgésico de los cannabinoides se relaciona con su capacidad para liberar  $\beta$ -endorfinas en tejidos periféricos (Ibrahim y cols., 2005). Además, los



cannabinoides actúan sobre receptores opioides  $\kappa$ , ya que tanto la naloxona como la norbinaltorfimina (antagonista opioide kappa) bloquean la antinocicepción producida por  $\Delta^9$ -THC de forma dosis dependiente (Smith y cols., 1994).

d) Modulando la liberación y actividad de otros neurotransmisores.

Existen neurotransmisores implicados en la transmisión del estímulo doloroso como la serotonina y noradrenalina que alteran la percepción del estímulo doloroso (Pertwee, 2001).

**- Efectos de los cannabinoides sobre la regulación de la temperatura corporal.**

Los receptores para cannabinoides y sus ligandos endógenos se encuentran localizados en regiones implicadas en el control de la temperatura corporal (Di Marzo y cols., 2002). El efecto hipotérmico de los cannabinoides parece implicar la modulación de las vías serotoninérgicas del área preóptica del hipotálamo.

Los compuestos cannabinoides pueden producir hipotermia de forma dosis-dependiente a través de la activación de receptores CB<sub>1</sub> (Fitton y Pertwee, 1982; Pertwee, 1990; Rawls y cols., 2002), de forma que el efecto hipotérmico del agonista WIN 55.212-2 es revertido tras la administración del antagonista CB<sub>1</sub>, rimonabant (SR 141716A), pero no tras la administración del antagonista CB<sub>2</sub>, SR 144528 (Rawls y cols., 2002).

**- Efectos de los cannabinoides sobre el aprendizaje y la memoria.**

Una de las propiedades comportamentales más comúnmente descrita para los compuestos cannabinoides es la de inducir alteraciones en los procesos de aprendizaje y memoria en humanos y animales de laboratorio (Lichtman y cols., 1995; Ranganathan y D'Souza, 2006; Riedel y Davies 2005).

Evidencias electrofisiológicas sugieren que el hipocampo juega un papel predominante en la alteración de la memoria y del aprendizaje inducida por compuestos cannabinoides. Dichos compuestos activan los receptores cannabinoides CB<sub>1</sub> que se encuentran ampliamente distribuidos a través del SNC, existiendo una alta densidad de

receptores CB<sub>1</sub> en el hipocampo (Matsuda y cols., 1993). En el hipocampo, estos compuestos impiden la plasticidad sináptica a largo plazo reduciendo presinápticamente la liberación de neurotransmisor (Misner y Sullivan, 1999). Los receptores CB<sub>1</sub> expresados en las terminales GABAérgicas son críticos en los déficits de memoria generados por  $\Delta^9$ -THC (Puighermanal y cols., 2009; Madroñal y cols., 2012). Además, se ha demostrado que su administración *in vivo* interrumpe la plasticidad sináptica hasta tres días después (Mato y cols., 2004).

Se ha demostrado que la administración directa de compuestos cannabinoides en el hipocampo perjudica la memoria espacial (Lichtman y cols., 1995; Mishima y cols., 2001; Wegener y cols., 2008). Otros estudios demuestran que los receptores CB<sub>1</sub> del hipocampo juegan un papel crítico en la alteración de la memoria inducida por la administración sistémica de compuestos cannabinoides. La administración intrahipocampal del antagonista selectivo CB<sub>1</sub>, SR 141716A, bloqueó completamente la alteración inducida por la administración sistémica de  $\Delta^9$ -THC (Wise y cols., 2009). Utilizando el silenciador del mensajero del receptor CB<sub>1</sub> con partículas lentivirales también se ha visto su participación en el condicionamiento clásico (Madroñal y cols., 2012).

#### **- Efectos de los cannabinoides sobre la ingesta de alimentos.**

La regulación del apetito, el hambre y la saciedad se realiza mediante señales hormonales generadas en ciertas áreas del SNC, en el sistema gastrointestinal y en tejido adiposo. En estas zonas está descrita la ubicación del sistema cannabinoide endógeno, lo que indica un posible papel regulador del sistema endocannabinoide sobre la ingesta de alimentos (Bisogno y cols., 1999; Pertwee, 2001b; Matias y cols., 2006). Se ha descrito que algunos endocannabinoides tienen un papel importante en la ingesta vía Para. La oleiletanolamida (OEA) tiene efectos inhibitorios en la ingesta de alimentos actuando sobre los receptores PPAR $\alpha$  que modulan el sistema nervioso autónomo. La anandamida y la OEA tienen efectos opuestos que sugieren que estos endocannabinoides forman parte del sistema sensor de saciedad (Rodríguez de Fonseca, 2001, 2004).

Los cannabinoides producen un incremento en la ingesta por administración sistémica o local en el SNC. Dicho efecto está mediado por el receptor CB<sub>1</sub> ya que la

administración del SR 141716A dio lugar a una disminución en la ingesta (Jamshidi y Taylor, 2001; Williams y Kirkham, 2002). Por tanto, los agonistas cannabinoides estimulan el apetito mientras que los antagonistas de los receptores CB<sub>1</sub> darían lugar a un efecto contrario, suprimiendo o disminuyendo el apetito (Di Marzo y cols., 2001).

- **Efectos de los cannabinoides sobre el control emocional.**

Existen numerosas evidencias que indican que el sistema cannabinoide endógeno participa en la regulación de las respuestas de tipo emocional. Diversos estudios en animales revelan que los efectos de los cannabinoides sobre el control de la ansiedad son bifásicos. A dosis bajas, los cannabinoides parecen producir efectos de tipo ansiolítico y por el contrario a dosis elevadas producen un efecto ansiogénico (Navarro y cols., 1993; Rodríguez de Fonseca y cols., 1996). Los mecanismos neurobiológicos subyacentes a las diferentes respuestas aún no se han dilucidado completamente. En roedores, el bloqueo farmacológico y genético de los receptores CB<sub>1</sub> produce un fenotipo de tipo ansiogénico que junto a la amplia presencia de receptores cannabinoides en regiones cerebrales relacionadas con el control emocional, como la amígdala, el hipocampo y la corteza, apuntan a la participación del sistema cannabinoide endógeno en la regulación de los estados de ansiedad. Además, se han descrito respuestas de tipo ansiolítico tras la administración de inhibidores de la degradación de los ligandos cannabinoides endógenos.

- **Efectos motivacionales de los cannabinoides.**

De modo similar a otros procesos adictivos, la iniciación en la adicción al *cannabis* se ha relacionado con su capacidad para inducir efectos de recompensa. Existen varios modelos animales para el estudio de las respuestas relacionadas con los efectos de recompensa inducidos por los cannabinoides. Estos procedimientos incluyen el paradigma de discriminación de drogas que evalúa los efectos subjetivos de la droga; la preferencia de lugar condicionada, que evalúa respuestas condicionadas relacionadas con los efectos de recompensa; los procedimientos de autoestimulación eléctrica intracraneal, que evalúan los efectos de la droga en los circuitos cerebrales de recompensa y los métodos de autoadministración, que evalúan directamente las propiedades reforzantes de la droga. Estos modelos experimentales han permitido

avanzar en el conocimiento del sustrato neurobiológico implicado en los efectos de recompensa del *cannabis*, que son cruciales para el proceso adictivo.

a) Implicación de los receptores cannabinoides en las propiedades adictivas de los cannabinoides.

La implicación específica de los receptores cannabinoides CB<sub>1</sub> en las respuestas farmacológicas de los cannabinoides relacionadas con sus propiedades adictivas ha sido claramente demostrado en estudios de animales que utilizan antagonistas selectivos de receptores CB<sub>1</sub> y ratones knock out deficientes en dichos receptores (Maldonado, 2002; Panlilio y cols., 2010).

Los receptores CB<sub>1</sub> están implicados selectivamente en el desarrollo de tolerancia a las diferentes respuestas farmacológicas de los cannabinoides y a las manifestaciones somáticas del síndrome de abstinencia, así como en las respuestas comportamentales inducidas por los cannabinoides en los procesos de discriminación de drogas, preferencia de plaza condicionada y aversión, autoestimulación intracraneal y autoadministración intravenosa (Maldonado, 2002). Sin embargo, el descubrimiento reciente de los receptores CB<sub>2</sub> en el SNC (Van Sickle y cols., 2005) y la implicación de estos receptores CB<sub>2</sub> centrales en respuestas comportamentales específicas de los cannabinoides (Garcia-Gutierrez y cols., 2010; Garcia-Gutierrez y Manzanares, 2010), abre nuevas posibilidades para investigar el papel potencial de los receptores CB<sub>2</sub> en las propiedades adictivas del *cannabis*.

b) Implicación de la dopamina en las propiedades adictivas de los cannabinoides.

En las propiedades adictivas de los cannabinoides también participan otros sistemas. El sistema mesocorticolímbico media las propiedades de recompensa de las drogas de abuso (Di Chiara y cols., 2004; Fattore y cols., 2008). Un componente importante de este sistema es la proyección dopaminérgica desde el área tegmental ventral (VTA) a la corteza frontal y estructuras límbicas, como el núcleo accumbens (NAc) y la amígdala. Los cannabinoides, de forma similar a otras drogas de abuso, incrementan la frecuencia de disparo espontáneo de las neuronas dopaminérgicas en el VTA (Gessa y cols., 1998). Además, el  $\Delta^9$ -THC y

el WIN 55,212-2 aumentan las concentraciones extracelulares de dopamina en el *shell*, pero no en el *core* del NAc (Tanda y cols., 1997), lo que ha sido relacionado con las propiedades reforzantes de la droga. La anandamida administrada de forma intravenosa también incrementó los niveles de dopamina en el *shell* del NAc (Solinas y cols., 2006). Además del NAc, otra región importante implicada en las propiedades de recompensa de los cannabinoides es el VTA, ya que la administración local de  $\Delta^9$ -THC en este área cerebral induce efectos de recompensa en la preferencia de plaza condicionada y en la autoadministración intracraneal de la droga (Zangen y cols., 2006).

Aunque los receptores CB<sub>1</sub> son abundantes en los circuitos de recompensa cerebrales, los agonistas cannabinoides no activan directamente las neuronas dopaminérgicas del VTA ya que dichos receptores no están presentes en estas células (Herkenham y cols., 1991b; Matsuda y cols., 1993), sino que se localizan en neuronas presinápticas glutamatérgicas y GABAérgicas. Por tanto, las neuronas dopaminérgicas de la vía mesocorticolímbica están bajo el control de las entradas excitadoras e inhibitoras que son moduladas por la activación del receptor CB<sub>1</sub>. En efecto, los cannabinoides inducen un incremento final de la actividad dopaminérgica neuronal del VTA que podría ser el resultado del balance funcional entre los efectos sobre interneuronas GABAérgicas inhibitoras y entradas glutamatérgicas excitadoras principalmente de la corteza prefrontal (Maldonado y cols., 2006; Fattore y cols., 2008).

A pesar del papel del sistema dopaminérgico en la recompensa a cannabinoides, la dopamina no parece jugar un papel importante en los efectos discriminatorios del  $\Delta^9$ -THC. De hecho, existen estudios que demuestran que ni el antagonista del receptor D<sub>1</sub>, SCH-23390, ni el antagonista D<sub>2</sub>, raclopride, reducen los efectos discriminatorios del  $\Delta^9$ -THC (Solinas y cols., 2010). Sin embargo, la cocaína, anfetamina y agonistas del receptor D<sub>2</sub> incrementan los efectos discriminatorios inducidos a bajas dosis de  $\Delta^9$ -THC (Solinas y cols., 2010), sugiriendo que la activación del sistema dopaminérgico modula positivamente esta respuesta cannabinoide.

La retirada espontánea de la administración crónica de  $\Delta^9$ -THC se asoció con una reducción de la transmisión dopaminérgica en el sistema límbico (Diana y cols., 1998). El sistema dopaminérgico no participa en la expresión somática del síndrome de abstinencia a cannabinoides ya que el tratamiento con antagonistas dopaminérgicos no atenuó la dependencia física a  $\Delta^9$ -THC (Sañudo-Peña y cols., 1999).

c) Implicación del sistema opioide endógeno en las propiedades adictivas de los cannabinoides.

Los receptores opiodes y sus ligandos endógenos juegan un importante papel en los procesos cerebrales de recompensa, y modulan el comportamiento y los efectos neuroquímicos de múltiples drogas de abuso incluidos los cannabinoides (Trigo y cols., 2010). La primera evidencia de esta participación es la superposición en la distribución de los receptores CB<sub>1</sub> y receptores  $\mu$ -opioides, revelada por estudios anatómicos en varias áreas del SNC, en el sistema límbico, mesencéfalo, tronco cerebral y médula espinal (Rodríguez y cols., 2001; Salio y cols., 2001). Además, estudios recientes han demostrado que los receptores CB<sub>1</sub> y  $\mu$ -opioides forman heterodímeros y pueden transmitir señales intracelulares a través de proteínas G comunes (Rios y cols., 2006; Hojo y cols., 2008). Esta asociación directa entre dichos receptores puede estar implicada en las interacciones entre los sistemas cannabinoide y opioide en la regulación de diferentes respuestas comportamentales, incluyendo la adicción a drogas.

- **Tolerancia y dependencia física a compuestos cannabinoides.**

Un criterio de diagnóstico de adicción incluido en el Manual de Enfermedades y Estadísticas de la Asociación Americana de Psiquiatría (DSM IV-TR), es el desarrollo de tolerancia, definido como el descenso en los efectos de la droga después del consumo repetido, o el incremento de la cantidad de droga consumida para mantener los efectos deseados (American Psychiatric Association, 2000). Después de la administración crónica, se desarrolla tolerancia a muchas de las respuestas farmacológicas de los cannabinoides, incluyendo antinocicepción, efectos locomotores, hipotermia, catalepsia, supresión del comportamiento operante, actividad anticonvulsivante, ataxia, liberación de corticoesterona y efecto en el tránsito gastrointestinal, peso corporal y funciones

cardiovasculares (Maldonado, 2002). Este fenómeno de tolerancia se ha demostrado en roedores, palomas, perros y monos (Abood y Martin, 1992).

El desarrollo de tolerancia cannabinoide es particularmente rápido, observándose un importante descenso de la respuesta aguda después de una segunda administración de agonista cannabinoide (Maldonado, 2002). Sin embargo, la tolerancia a los efectos del  $\Delta^9$ -THC puede desarrollarse de forma diferencial dependiendo de la respuesta fisiológica o comportamental (Pope y cols., 2001).

Varios estudios demuestran que la administración crónica de dosis elevadas de cannabinoides como  $\Delta^9$ -THC, WIN 55,212-2 y HU-210 produce un estado de dependencia física en el animal de experimentación (Maldonado y Rodríguez de Fonseca, 2002). Esta dependencia física se pone de manifiesto en animales tratados crónicamente con dichos agonistas mediante la aparición de un síndrome de abstinencia después de la administración de un antagonista cannabinoide.

**- Síndrome de abstinencia cannabinoide.**

La presencia de síndrome de abstinencia es otro criterio para la diagnosis de adicción incluido en DSM IV-TR, definido por la aparición de síntomas fisiológicos de abstinencia después de la retirada del consumo crónico de la droga, o el consumo de la misma o droga similar para aliviar las manifestaciones de abstinencia (American Psychiatric Association, 2000).

En roedores, palomas, perros y monos, varios estudios han demostrado la ausencia de signos somáticos de retirada espontánea después de un tratamiento crónico de  $\Delta^9$ -THC incluso después de la administración de dosis muy altas de dicho compuesto (Maldonado, 2002). Del mismo modo, no se observaron manifestaciones físicas de abstinencia después del tratamiento crónico con otros agonistas cannabinoides (Young y cols., 1981), aunque se observaron signos somáticos de abstinencia después de una interrupción brusca del tratamiento crónico con WIN 55,212-2, agonista cannabinoide más potente y con una vida media más corta que el  $\Delta^9$ -THC (Aceto y cols., 2001). Sin embargo, se ha demostrado que la administración de antagonistas cannabinoides CB<sub>1</sub>, SR 141716A, precipita manifestaciones somáticas de abstinencia en roedores  $\Delta^9$ -THC dependientes (Maldonado, 2002).

Estos resultados están de acuerdo con la presencia de manifestaciones somáticas de abstinencia en humanos después de un uso discontinuo de marihuana (Budney y Hughes, 2006). Se han manifestado efectos subjetivos asociados al síndrome de abstinencia a THC en monos rhesus que utilizan el procedimiento de discriminación de droga (Stewart y McMahon, 2010).





## ***OBJETIVOS***



El sistema dopaminérgico, a través de sus receptores más representativos, D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>, modula funcionalmente las acciones inducidas por agonistas cannabinoides y por psicoestimulantes. En la presente tesis doctoral, se aborda el esclarecimiento de la participación del sistema dopaminérgico en las acciones de los cannabinoides y los psicoestimulantes, mediante el abordaje molecular, bioquímico, anatómico y comportamental.

La importancia de la evaluación de esta hipótesis se basa en la existencia de evidencias que indican que el sistema dopaminérgico a través de sus receptores más representativos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> interacciona con el sistema cannabinoide y esta interacción es importante en las respuestas conductuales mediadas por dichos receptores, en las acciones de los cannabinoides y en el desarrollo de adicción. Por otro lado, se evaluará la importancia de la inactivación del receptor D<sub>2</sub> en las acciones de los psicoestimulantes.

Los objetivos específicos del presente proyecto de tesis doctoral son los siguientes:

1. Determinar el sustrato anatómico, a nivel celular, de la interacción del sistema dopaminérgico y el sistema cannabinoide.
2. Precisar la modulación de la expresión del CB<sub>1</sub> por el sistema dopaminérgico en ratones carentes del receptor D<sub>1</sub> o D<sub>2</sub>.
3. Determinar el papel funcional del sistema cannabinoide endógeno en respuestas conductuales mediadas por los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> evaluando la conducta rotacional, grooming y estereotipias en rata y ratones D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>.
4. Determinar a nivel comportamental el papel de los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> en las acciones mediadas por los cannabinoides: aspectos adictivos, motores, analgésicos y de temperatura del agonista cannabinoide THC en ratones KO (D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> y D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>) y sus correspondientes WT.
5. Determinar el impacto de la inactivación del receptor D<sub>2</sub> en las acciones de los psicoestimulantes, anfetamina y cocaína y del agonista dopaminérgico D<sub>1</sub>, SKF 81297, mediante la evaluación de la actividad motora y la inducción de la expresión de factores de transcripción y péptidos tras la administración de estos compuestos.



## ***MATERIAL Y MÉTODOS***



## 1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Para los estudios de distribución del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>, se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Wistar de 2-3 meses de edad y con un peso aproximado de 250-300 g (Charles River, Barcelona). Se llevaron a cabo estudios de distribución de dicho receptor y de comportamiento, en ratones hembra adultos knock-out (KO), para los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> (D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>) generados en el laboratorio del Dr. Tonegawa (Xu y cols, 1994) y D<sub>2</sub> (D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>) generados en el laboratorio del Dr. Grandy (Kelly y cols, 1997) y en sus correspondientes wild-type (WT). Se emplearon ratones de 4-12 meses de edad y un peso aproximado de 20-35 g.

Los animales de experimentación se mantuvieron en el estabulario del Instituto Cajal, Centro de Investigación en Neurobiología perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Recibieron agua y alimentos libremente (piensos estándar y enriquecidos) en condiciones de temperatura media controlada de 22 ± 1 °C y con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas.

En el mantenimiento y los procedimientos experimentales realizados con los animales, se siguieron las normas dictadas por la Unión Europea (Council Directive 86/609/EEC).

## 2. GENOTIPO DE LÍNEAS TRANSGÉNICAS DE RATONES.

El genotipo de los ratones se realizó mediante el método de Southern blot, descrito por Southern en 1975 y el de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

### 2.1. Genotipo de ratones D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>.

La técnica de Southern blot es un método que permite la detección de secuencias específicas, en poblaciones complejas de fragmentos de ADN. Los fragmentos específicos de ADN, generados durante las primeras fases, se transfirieron a una membrana de nylon y, posteriormente, se hibridaron con una sonda específica marcada radiactivamente con <sup>32</sup>P. Mediante la realización de esta técnica se discriminó entre ratones de fenotipo salvaje (wild-type, WT, o D<sub>1</sub>R<sup>+/+</sup>) y ratones D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>. El proceso comprende las siguientes fases:



a) Extracción de ADN.

La extracción del ADN del tejido se llevó a cabo cortando una porción de la cola del ratón (aproximadamente 1 cm) digiriéndola con 500 µl de solución de lisis (100 mM Tris, pH 8.0, 200 mM NaCl, 0.2% SDS, 5 mM EDTA, 200 µl/ml proteinasa K, Boehringer Mannheim, Promega, New England Biolabs, MBI Fermentas y agua destilada). La muestra de tejido se mantuvo, durante toda la noche, en un horno de hibridación a 55°C y en movimiento constante. A continuación, se microcentrifugó durante 20-30 minutos a 15.000 r.p.m. y, descartando el precipitado, el sobrenadante se trasladó a un tubo nuevo donde se mezcló con 500 µl de Isopropanol 100% (Merck, Germany) para precipitar el ADN que se encuentra en suspensión. La hebra de ADN formada, se trasladó a un tubo nuevo disolviéndola en 150 µl de agua destilada a 50°C, durante una noche, y se almacenó después a -20 °C para su posterior utilización.

b) Digestión enzimática del ADN con endonucleasas de restricción.

En el tubo de digestión se añadieron 6 µg de ADN, 50 unidades del enzima Bgl II (Fermentas, Madrid, España), tampón de digestión específico del enzima (Buffer O<sup>+</sup>) y agua destilada, hasta completar un volumen final de reacción de 50 µl. Después, el tubo de digestión se incubó durante toda la noche en un baño a 37 °C.

c) Electroforesis en gel de agarosa.

Con la digestión enzimática, se obtuvieron dos fragmentos de ADN que se separaron en función del tamaño mediante electroforesis horizontal. El procedimiento realizado se describe a continuación:

Se preparó un gel de agarosa al 0.8 % en una solución tampón 0.5x TBE (44 mM Tris base, 44 mM ac. bórico y 1 mM de EDTA) con 100-150 µg de bromuro de etidio. Este compuesto actúa intercalándose entre las bases del ADN, emitiendo fluorescencia al recibir luz UV a 254 nm. De esta forma, se visualizaron las bandas de ADN separadas durante el proceso de electroforesis.

El producto de la digestión enzimática se mezcló con un tampón de carga (Gel loading solution, tipo I, Sigma-aldrich CO, St. Louis, USA) que permitió el seguimiento

de la migración del ADN. En los geles de agarosa, el colorante xileno-cianol migra junto con las bandas de 4 Kb, y el azul de bromofenol con las de 0.50 Kb. El ADN tiene carga negativa, así, la migración se realizó hacia el polo positivo de la cubeta de electroforesis, separándose los fragmentos por pesos moleculares. Para determinar el peso molecular de los fragmentos de las muestras estudiadas se cargó un marcador de peso molecular 123 bp ADN Ladder (1 µg) (Invitrogen, Madrid, España) que, durante la electroforesis, se separa en distintos fragmentos, de los cuales el más pequeño es de 123 bp y el mayor de 4182 bp. A continuación, se llevó a cabo la electroforesis del gel con un voltaje constante de 150 mv y una duración aproximada de 5 h. En dichas condiciones, se obtuvo la separación de los fragmentos de ADN, que se visualizaron mediante un sistema de transiluminación UV acoplado a una cámara digital (Gelprinter Super) y utilizando el software (Scion image, Gelprinter Super, Madrid, España).

d) Transferencia del ADN a la membrana.

Los fragmentos de ADN separados en el paso anterior se transfirieron a una membrana de nylon cargada positivamente (GeneScreen Plus NEF 988, PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA, USA), de forma que el ADN quedó retenido mediante un enlace iónico.

En primer lugar se realizó la desnaturalización del gel, sumergiéndolo en una solución ácida (HCl dilución 1:20) durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se lavó con agua destilada y, finalmente, se sumergió en una solución alcalina desnaturalizante (NaCl 1.5M; NaOH 0.5M) durante 45 minutos, para romper los enlaces de hidrógeno que unen las dos cadenas. Todo el proceso se llevó a cabo con agitación continua.

La transferencia del ADN a la membrana, se realizó mediante el método descrito por Southern en 1975. La membrana de nylon se incubó en solución alcalina desnaturalizante durante 5 minutos y se dispuso sobre el gel para realizar la transferencia del ADN (15-20 h). La solución desnaturalizante asciende, por capilaridad, a través del papel de filtro y arrastra los fragmentos de ADN que se encuentran en el gel, transfiriéndolos a la membrana donde quedan retenidos.

Después de la transferencia, la membrana se sumergió en solución alcalina desnaturalizante durante 10 minutos y en 2x SSC (NaCl 0.3M; Citrato sódico 0.03M) durante 5 minutos. Se dejó secar durante 1-2 h a temperatura ambiente, y el ADN

retenido en la membrana de forma covalente se fijó con una fuente de luz UV de 312 nm durante 20s ( *UV Stratalinker<sup>TM</sup> 2400*, Stratagene).

e) Hibridación de la membrana.

Para visualizar los fragmentos de ADN retenidos en la membrana de nylon, se llevó a cabo el proceso de hibridación con una sonda radiactiva previamente marcada con el isótopo  $^{32}\text{P}$ , proceso que se realizó siguiendo diferentes pasos:

- En primer lugar se llevó a cabo la prehibridación de la membrana, que consiste en su incubación con un tampón de hibridación cuya composición es la siguiente: 40% formamida desionizada (Fluka) (disminuye la temperatura de hibridación); sal sódica de sulfato de dextrano al 10% (Amersham Pharmacia Biotech) (mejora el rendimiento de la hibridación); 1M NaCl; 50mM Tris a pH 7.5; solución de Denhardt's (Amersham Pharmacia Biotech) a una concentración 1x (disminuye la señal de fondo en la hibridación); 0.5% SDS; ADN de esperma de salmón a una concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (reduce la formación de uniones inespecíficas entre las ribosondas y otras estructuras químicas). Este paso se desarrolló en un horno de hibridación con movimiento constante, a una temperatura de 42 °C durante 2h. Con la prehibridación evitamos la formación de uniones inespecíficas de ADN en la membrana.

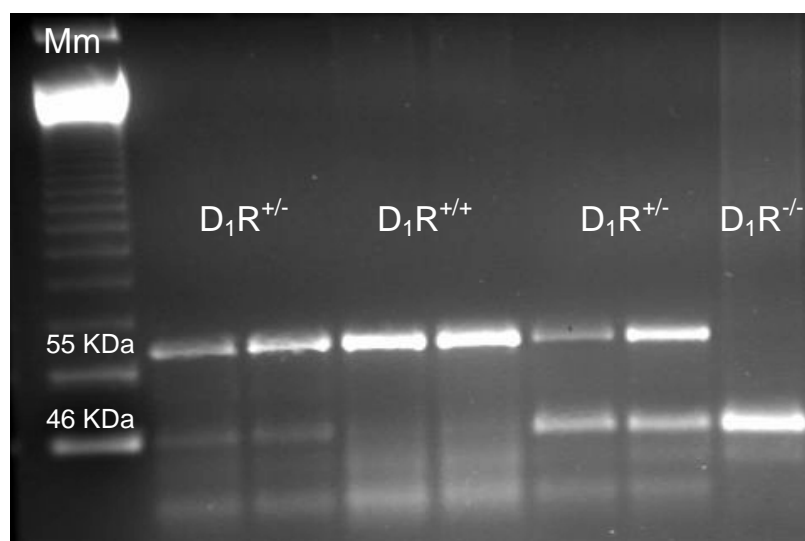
- En segundo lugar, se procedió al marcaje del ADN complementario al ADN unido a la membrana. El ADN plasmídico (0.4  $\mu\text{g}$ ), previamente linealizado con 20 unidades del enzima Cla I (Promega) y 10 unidades del enzima Bgl II (Fermentas), se desnaturalizó en un baño seco a 95 °C durante 5 minutos. A continuación, se añadieron 30  $\mu\text{Ci}$  de  $\alpha$ -dATP/ 30  $\mu\text{Ci}$  de  $\alpha$ -dCTP marcados con  $^{32}\text{P}$  (emisor de radiación  $\beta$ ) (NEN#: BLU512H/ BLU513H, Amersham), 10  $\mu\text{l}$  de tampón OLB (compuesto por los nucleótidos necesarios para la síntesis de la hebra de ADN complementaria, a excepción de los nucleótidos marcados) y 6 unidades de polimerasa Klenow, enzima que intercala los nucleótidos y permite la síntesis de la sonda de ADN marcada. Esta mezcla se incubó durante 1h a 37 °C en un baño de agua y con agitación constante. Posteriormente, se purificó el producto de la reacción con una columna de Sephadex (ProbeQuant G-50, Amersham) obteniendo así la sonda radiactiva purificada. Se añadieron 1 mg de ADN de esperma de salmón y 300  $\mu\text{l}$  de tampón TE (Tris-Cl 10mM

y EDTA 1mM), y se llevó a un baño seco a 95 °C durante 5 minutos enfriándolo inmediatamente en hielo durante 2 minutos.

- En la etapa de hibridación, la mezcla anterior se añadió a un nuevo tampón de hibridación con el que se incubó la membrana en un horno con movimiento constante durante 18-20h a una temperatura de 42 °C.

- La membrana se sometió a tres lavados de 30 minutos a la misma temperatura y con movimiento constante en 0.1M SDS y 0.2M SSC, y se dejó secar durante 1h.

- A continuación se expuso la membrana a una película de autorradiografía (Kodak MS, Amersham) en un cassette Kodak (Amersham) a lo largo de 3-5 días a -80°C (la emisión de partículas  $\beta$  del isótopo radiactivo es mayor a bajas temperaturas porque se estabilizan los iones y átomos de plata de la imagen fotográfica). Finalmente, las bandas de ADN de la membrana, impresionadas en la película de autorradiografía, permitieron identificar el genotipo de los ratones. Para el caso estudiado, si aparece una única banda a 5.5 Kb es un ratón homocigoto WT ( $D_1R^{+/+}$ ), si solamente hay una banda a 4.6 Kb se trata de un ratón homocigoto KO ( $D_1R^{-/-}$ ), y si aparecen dos bandas, una a 5.5 Kb y otra a 4.6 Kb, el ratón es heterocigoto ( $D_1R^{+/-}$ ).



**Figura 7. Detección de secuencias específicas de ADN para la identificación del genotipo de ratones  $D_1$  mediante el método de Southern Blot.**

## 2.2 Genotipo de ratones $D_2R^{-/-}$ .

El análisis de los ratones  $D_2$  se realizó con la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), método de detección por amplificación selectiva de un fragmento de ADN específico, que permitió discriminar entre ratones  $D_2R^{+/+}$  y ratones  $D_2R^{-/-}$  (Kelly y cols, 1997).

En primer lugar, se preparó una mezcla con los siguientes componentes: solución tampón de la Taq polimerasa 10x (Fermentas, Madrid, España), 2.5 mM dNTPs, 2 mM  $MgCl_2$ , 10  $\mu$ M Primer  $D_2$ /Intrón  $I_7$  (Molecular probes, Invitrogen, España), 10  $\mu$ M Primer WT (upper o lower), 10  $\mu$ M Primer KO (upper o lower) (Molecular probes, Invitrogen, España) y agua destilada. A esta mezcla se añadió una concentración de 0.3  $\mu$ g/ $\mu$ l del ADN a identificar. Después de la hibridación de estos oligonucleótidos, la duplicación se realizó por la acción del enzima Taq polimerasa 0.5 u/ $\mu$ l (Fermentas, Madrid, España), dando lugar a la elongación de los oligonucleótidos mediante el uso del ADN complementario que actúa como molde. Se obtienen así un gran número de copias, mediante una serie de ciclos que comprenden una etapa de hibridación del cebador, otra de elongación del mismo y una etapa final de desnaturalización (separa la hebra de nueva formación del molde original).

Primer  $I_7$  5' TGA TGA CTG CGA ATG TTG GTG TGC 3'

Primer WT 5' CCG AGC CAA GCT AAC ACT GCA GAG 3'

Primer KO 5' AGG ATT GGG AAG ACA ATA GCA G 3'

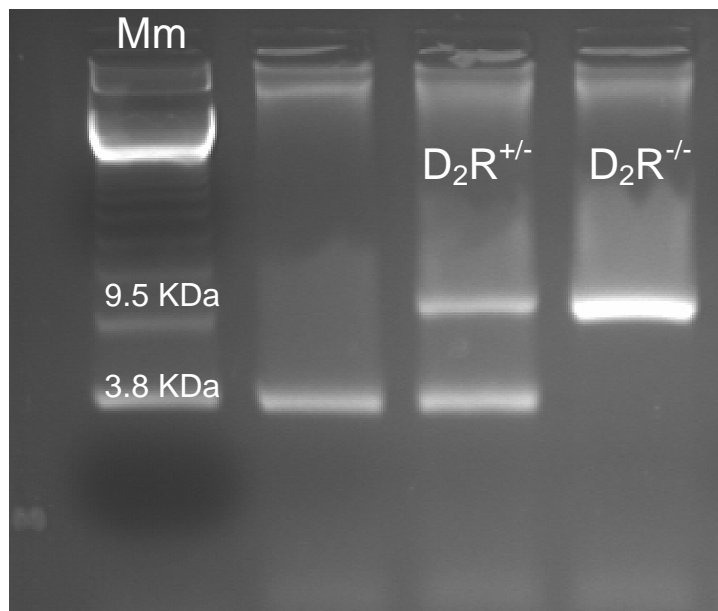
Se detallan, a continuación, las distintas fases de la PCR :

En la primera fase, se realizó una etapa de desnaturalización a 94°C durante 5 min + hot start 80°C ; se hizo entonces una pausa y se añadió la mezcla que contiene la enzima Taq polimerasa. La segunda fase continuó con 15 ciclos, en los que la temperatura de anillación fue de 67 °C. En la tercera fase, el número de ciclos fue 25 y la temperatura de anillación 52°C. Por fin, en la cuarta y última fase la temperatura alcanzada fue 72°C.

El producto de PCR se separó mediante electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1 % en TAE 1x (40 mM Tris base, 1 mM EDTA, 1% Ácido acético glacial). Se mezcló con un tampón de carga (Gel loading solution) y en uno de los pocillos del gel se cargó un marcador de peso molecular, 123 bp ADN Ladder (1  $\mu$ g), llevándose a

cabo la electroforesis del gel con un voltaje constante de 150 mv y una duración aproximada de 1h. En tales condiciones, se obtuvo la separación de los fragmentos de ADN que se visualizaron mediante el sistema de transiluminación UV citado anteriormente.

Finalmente, observamos las bandas de ADN separadas en el gel de agarosa. De esta forma, se diferenció entre ratones WT y KO con el siguiente criterio: si aparece una única banda a 3.8 Kb, es un ratón homocigoto WT ( $D_2R^{+/+}$ ); si solamente hay una banda a 9.5 Kb, se trata de un ratón homocigoto WT ( $D_2R^{-/-}$ ); y si aparecen dos bandas, una a 9.5 Kb y otra a 3.8 Kb, el ratón es heterocigoto ( $D_2R^{+/-}$ ).



**Figura 8. Amplificación selectiva de un fragmento específico de ADN para la identificación del genotipo de ratones  $D_2$  mediante PCR.**

### 3. ESTUDIOS COMPORTAMENTALES.

#### 3.1. Drogas y dosis.

Los agonistas del receptor dopaminérgico D<sub>1</sub>, **SKF 38393** y **SKF 81297** (Tocris, Bristol, Reino Unido), disueltos en agua doblemente destilada, y el **quinpirol** (agonista del receptor de dopamina D<sub>2</sub>, RBI, Natick, EEUU), disuelto en etanol al 20%, fueron administrados a una dosis de 0, 0.5 y 1 µg/µl en inyecciones intraestriatales, y 5 mg/kg (SKF 38393, SKF 81297) o 1 mg/kg (quinpirol) en administración subcutánea. La **bromocriptina**, agonista del receptor D<sub>2</sub> y el **Δ<sup>8</sup>-tetrahidrocannabinol-dimetil-heptil (HU-210)**, agonista del receptor CB<sub>1</sub> (Tocris) fueron disueltos en agua destilada y etanol al 10% y se administraron en inyección intraestriatal (bromocriptina 0.5 y 10 µg/µl) e intraperitoneal (HU-210 20 µg/kg).

El antagonista del receptor CB<sub>1</sub>, **SR 141716A** [N-piperidin-1-il-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxiamida] (donado por Sanofi-Synthelabo Recherche, Francia), se disolvió en DMSO al 20% y se administró a una dosis de 0, 1, y 1.5 µg/µl en inyección intraestriatal, o 0.3 y 1 mg/kg en inyección intraperitoneal (i.p). El bloqueante de la recaptación celular de anandamida, **AM 404** (Tocris), se disolvió en tween 80:propylen glicol:salina (5:5:90 v/v) y se administró a una dosis de 0, 2.5 y 5 µg/µl en inyección intraestriatal, y 0.3 mg/kg o 10 mg/kg en inyección i.p.. Las inyecciones locales en el estriado se realizaron en un volumen de 1.5 µl. En cada caso, el mismo volumen del vehículo apropiado se utilizó para la dosis 0. Para seleccionar el sitio de inyección seguimos el método de Routtenberg, 1972. De acuerdo con él, una inyección de 1.5 µl difunde aproximadamente 3 mm<sup>3</sup>, que sería un área bastante significativa del estriado (Routtenberg, 1972).

#### 3.2. Grooming y movimientos orales.

Los animales de experimentación (ratas y ratones, 8 por grupo) se depositaron y manipularon durante una semana, en cajas de observación de 30x40x30. Para los estudios comportamentales, se realizó una grabación de los animales en las cajas de observación y se registró el tiempo empleado en grooming y el número de estereotipias orales siguiendo métodos anteriormente descritos (Beltramo y cols., 2000; Giuffrida y cols., 1999). El comportamiento de grooming y los movimientos orales se registraron por períodos de 5 minutos y en intervalos de 5, 15, 30 y 60 minutos después de la inyección.

Los datos obtenidos se presentaron como la suma de todos los intervalos (medias  $\pm$  SEM). El análisis estadístico se realizó utilizando análisis de varianza (ANOVA de una y dos vías), seguidos de una t de student o Newman-Keuls, y se completaron utilizando un programa STATA (Intercooled Stata 6.0, Stata Corporation, Collage Station, TX). Se consideró significativo un nivel de probabilidad del 5%.

### **3.3. Comportamiento rotacional.**

Las inyecciones locales, en el estriado de rata, se realizaron con una cánula guía implantada una semana antes de los estudios experimentales. La cánula (calibre 22) se implantó en el estriado de ratas anestesiadas con un estereotáxico Kopf, 2 mm por encima del correspondiente sitio de inyección (coordenadas en mm de bregma y dura, AP= + 0.5, L= -3 y V= -5.5, Paxinos y Watson, 2005), sujetándose al cráneo con cemento dental y con un obturador de calibre 30. Las inyecciones se realizaron en la caja de acondicionamiento, reemplazando la cánula obturadora por una cánula interna de calibre 30 (Small Parts Miami, USA) conectada a una jeringa Hamilton y a una bomba de infusión. Las soluciones se inyectaron durante un intervalo de 5 minutos, sustituyendo a continuación la cánula interna por el obturador.

Los estudios comportamentales se realizaron con grupos de 8-10 animales. Para estudiar el efecto de los componentes individualmente, el agonista dopaminérgico SKF 38393, quinpirol, bromocriptina y agonistas CB<sub>1</sub> se administraron a diferentes dosis y en distintos grupos de animales. Para el estudio de la interacción entre el sistema dopaminérgico y cannabinoide se utilizó SKF 38393, agonista dopaminérgico D<sub>1</sub> (0.5 o 1  $\mu$ g/ $\mu$ l); SR 141716A, antagonista CB<sub>1</sub> (1.5  $\mu$ g/ $\mu$ l) o AM 404, agonista CB<sub>1</sub> (5  $\mu$ g/ $\mu$ l). El vehículo, SR 141716A o AM 404 se inyectaron 5 minutos antes del SKF 38393. Las dosis utilizadas dieron lugar a un comportamiento rotativo máximo.

Las tendencias locomotoras direccionales se evaluaron cuantificando las rotaciones ipsilaterales y contralaterales inducidas por la infusión de componentes individuales o combinados. Las rotaciones se cuantificaron con un fotómetro (Panlab, Barcelona, España) durante los 60 minutos siguientes a la inyección.

Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de una vía, para drogas administradas individualmente y ANOVA de dos vías para combinación de drogas seguido por un test de Tukey's para interacción de drogas.



Se realizaron estudios comportamentales en ratones  $D_1R^{-/-}$  y  $D_2R^{-/-}$  y sus correspondientes WT, cuya finalidad fue la determinación de los aspectos adictivos, motores, analgésicos y de temperatura del agonista cannabinoide,  $\Delta^9$ -**tetrahidrocannabinol (THC)**. Además, en ratones  $D_2R^{+/+}$  y  $D_2R^{-/-}$  se llevaron a cabo estudios de actividad motora con psicoestimulantes (**anfetamina y cocaína**) y **SKF 81297**, agonista dopaminérgico  $D_1$ .

### **3.4. Test de preferencia espacial con agonistas cannabinoides en ratones WT y KO de receptores dopaminérgicos.**

Se llevaron a cabo estudios de condicionamiento espacial con agonistas cannabinoides, con el fin de determinar si existe un componente dopaminérgico en la adicción a cannabinoides.

Para evaluar los aspectos motivacionales de la administración crónica de agonistas cannabinoides se realizó un **test de condicionamiento espacial**, que representa un modelo animal del deseo compulsivo de someterse a los efectos de los cannabinoides. La caja de preferencia espacial consta de dos compartimentos cuadrados (15x15x15 cm), diferenciados por distintos estímulos (puntos y rayas en paredes y suelos con distintas texturas), separados por un compartimento central triangular neutro que no presenta ningún estímulo. Además de los estímulos internos de la caja, se pueden disponer otros estímulos externos en el habitáculo facilitando así la situación espacial. Las condiciones de luz deben ser muy suaves para evitar alteraciones en los animales de experimentación. El movimiento y localización de los ratones se registró a través de un software de supervisión automatizado (Videotrack, View Point, Lyon) (Smart, Panlab, Barcelona), que retransmitió las imágenes desde una cámara de vídeo colocada sobre la caja de condicionamiento.

El protocolo experimental consta de tres fases:

- a) Fase de libre acceso. En esta primera fase, los animales *naïve* tuvieron libre acceso a los distintos compartimentos durante 20 minutos. Se registró el número de entradas y el tiempo permanecido en cada uno de ellos.
- b) Fase de condicionamiento. A cada grupo experimental se le administró diariamente droga o vehículo de forma aleatoria en uno de los dos compartimentos de la caja, siempre el mismo, durante 10 días consecutivos. En

los días pares, los ratones recibieron una inyección del compuesto cannabinoide o vehículo y se depositaron, inmediatamente después, en uno de los compartimentos individuales, durante 40 minutos. Y en los días impares todos los animales fueron inyectados con vehículo y se depositaron en el compartimento opuesto. De esta forma, los animales de experimentación asociaron un determinado compartimento con el vehículo y el otro con la droga administrada.

- c) Fase de evaluación. 24 horas después de la última inyección se depositó a cada animal en el compartimento neutro, permitiendo su libre acceso al resto de compartimentos. Se registró, durante 20 minutos, el número de entradas y el tiempo que permanecieron en el compartimento asociado a la administración del compuesto cannabinoide. Este registro permitió establecer un índice de la preferencia de lugar asociado a la administración de la droga.

Se realizó el *test de preferencia espacial* en los distintos grupos de animales, administrándoles una inyección intraperitoneal (i.p.) de THC (THC Pharm GmbH The health concept, Frankfurt, Alemania) una vez al día, siendo la dosis 1 mg/kg ( $\Delta^9$ -THC en 5% de etanol, 5% Cremofor El y 90% de agua destilada). El grupo control recibió una inyección intraperitoneal de vehículo (5% de etanol, 5% Cremofor El y 90% de agua destilada).

Para evitar los posibles efectos motivacionales negativos que produce la primera exposición a la droga, 24 horas antes del comienzo de la fase de condicionamiento los ratones tratados recibieron una dosis previa de THC en su jaula (1 mg/kg, i.p.) (Valjent y Maldonado, 2000).

### **3.5. Test de aversión espacial con agonistas cannabinoides en ratones WT y KO de receptores dopaminérgicos.**

El test nos permitió evaluar la aversión espacial inducida por la administración crónica de agonistas cannabinoides.

El diseño experimental, las cajas utilizadas y las condiciones en las que se realizó dicho experimento fueron exactamente igual al del test de preferencia espacial. Para que un animal desarrolle aversión espacial, la dosis administrada debe ser elevada con respecto a la que produce preferencia espacial; por tanto, la única diferencia en este experimento fue la dosis administrada de THC (5 mg/kg).

El protocolo experimental consta de las fases descritas anteriormente, a saber, fase de libre acceso, fase de condicionamiento y fase de evaluación. Se registró el número de entradas y el tiempo que permanecieron los animales en el compartimento asociado a la administración del compuesto cannabinoide. Este registro permitió establecer un índice de la aversión de lugar, asociado a la administración de la droga.

Se realizó el *test de aversión espacial* en los distintos grupos de animales, administrándoles una vez al día una inyección de THC (5 mg/kg, i.p.) o vehículo.

### **3.6. Síndrome de abstinencia a cannabinoides en ratones WT y KO de receptores dopaminérgicos.**

Con el fin de determinar si existe un componente dopaminérgico en la adicción a cannabinoides se llevaron a cabo estudios del síndrome de abstinencia a cannabinoides. Este test nos permitió obtener información sobre los síntomas físicos de la abstinencia.

Se dividieron los grupos experimentales en ratones tratados con THC (20 mg/kg x 2 i.p, durante 5 días) y en ratones controles que recibieron una inyección de vehículo durante todo el tratamiento. El sexto día, se precipitó el síndrome de abstinencia mediante una única inyección intraperitoneal de 10 mg/kg de un antagonista específico de los receptores cannabinoides CB<sub>1</sub>, **SR 141716 A** (10% de etanol, 10% Cremofor El y 80% de agua destilada) proporcionado por Sanofi Recherche (Madrid).

Cuatro horas después de la última inyección de THC o vehículo, se situó a los ratones, individualmente, en un área de observación circular durante un periodo de habituación de 15 minutos. Inmediatamente después, los animales se observaron durante 15 minutos para verificar la presencia de un comportamiento normal y a continuación, recibieron 10 mg/kg del antagonista, SR 141716A que precipitó el síndrome de abstinencia. Durante los 45 minutos siguientes, se evaluaron los distintos síntomas somáticos que aparecieron en los ratones tratados. La observación se dividió en intervalos de 5 minutos y se cuantificó el número de apariciones o la presencia o no de los signos. Se cuantificaron las sacudidas de tronco (wet dog shakes) o cabeza, temblor en la pata, sniffing o aspiraciones y retorcimientos, evaluando el número de episodios. La presencia o ausencia de aseo de los genitales, erección, temblor corporal, ptosis parpebral, piloerección, ataxia, diarrea, masticación y postura encorvada se evaluó asignándole “1” a la presencia o “0” a la ausencia de dichos signos en cada intervalo de 5 min. Los valores cuantitativos de los diferentes signos estudiados en cada animal se calcularon añadiendo los valores obtenidos en cada intervalo de tiempo. A

continuación, se determinó un *score* global de abstinencia para cada animal con límites de 0 a 100, dando a cada signo individual un valor relativo, como se ha descrito anteriormente en distintos trabajos (Hutcheson y cols., 1998; Valverde y cols., 2000; Ghozland y cols., 2002).

### **3.7. Estudios de actividad locomotora espontánea en ratones WT y KO de receptores dopaminérgicos.**

Los estudios de actividad motora se llevaron a cabo en ratones WT y KO con el fin de estudiar el papel de los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> en la respuesta motora de THC (agonista cannabinoide) y el papel del receptor D<sub>2</sub> en la respuesta motora de agonistas indirectos (anfetamina o cocaína) o selectivos (SKF 81297) del receptor dopaminérgico D<sub>1</sub>.

Los estudios se realizaron empleando una caja de actividad de metacrilato de 40x30x30 cm, dividida en cuatro compartimentos. La conducta locomotora se evaluó mediante un contador de actividad, del que disponía cada caja de observación, compuesto por un sistema de fotocélulas que registra el movimiento del animal. Estas cajas están equipadas con dos filas de células fotoeléctricas (superior e inferior). El sistema consta, además, de dos filas enfrentadas a las anteriores, de idénticas características en cuanto a situación y a altura pero constituidas por elementos que emiten rayos infrarrojos. El sistema se conecta al ordenador y el software cuantifica, de forma acumulativa, el número de cortes o cruces en la fila superior (medida de la actividad locomotora vertical) y en la fila inferior (medida de la actividad locomotora horizontal).

En las sesiones de evaluación se situaron dos animales por caja, enfrentados diagonalmente para evitar las interferencias que se producirían entre los haces de luz infrarroja que corta cada animal.

#### **- Actividad locomotora inducida por el agonista cannabinoide THC.**

Con la finalidad de evaluar los efectos del THC sobre el comportamiento motor, se realizó un test de actividad motora en ratones WT y KO para los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>.

Los animales de experimentación se habituaron a las cajas de actividad y a los distintos estímulos externos durante un periodo de dos o tres días. Después, se realizó un tratamiento crónico, administrando el agonista cannabinoide, THC o vehículo por vía intracerebroventricular (i.c.v.). La dosis fue 10 µg (repartida en dos dosis diarias/ 5

días), inyectándose manualmente en el ventrículo un volumen de 4  $\mu$ l (Sanchez-Blazquez P y cols., 1995). Inmediatamente después se evaluó la actividad locomotora durante 60 minutos.

También se llevó a cabo un segundo tratamiento crónico administrando, en este caso, 10 mg/kg i.p., 10-12 días, dosis única diaria de THC o vehículo. Se depositaron los grupos de ratones experimentales en la caja de actividad 30 minutos después de la inyección y se evaluó la actividad locomotora durante 60 minutos.

- **Actividad locomotora inducida por los psicoestimulantes: anfetamina y cocaína.**

Se realizaron estudios de tolerancia y sensibilización a cocaína y anfetamina, evaluándose la actividad motora inducida por dichos psicoestimulantes en ratones WT y KO para los receptores D<sub>2</sub>. Para ello, se aplicó el test de actividad motora descrito anteriormente, tratando a los animales con una única inyección, en el caso del tratamiento agudo, y con una inyección diaria durante 14 días consecutivos para un tratamiento crónico.

Se sometió a los animales de experimentación a un periodo de habituación a las cajas de actividad y a los distintos estímulos del entorno. Después de la inyección los animales se depositaron en las distintas cajas, evaluándose la actividad locomotora durante 60 minutos. En el caso del tratamiento agudo, se administró a los distintos grupos una única dosis de cocaína (10 mg/kg/i.p., proporcionada por el Ministerio de Sanidad), anfetamina (2.5 mg/kg/i.p., Sigma-Aldrich, Madrid, España) o vehículo. Para el tratamiento crónico, se emplearon 14 días consecutivos con una dosis única diaria en un volumen equivalente al peso del animal.

Para estudiar el patrón de expresión del gen de inducción temprana c-fos en el estriado, los animales tratados se sacrificaron por perfusión intracardíaca el último día de tratamiento, inmediatamente después del periodo de evaluación de la actividad locomotora. Se extrajo el cerebro fijado y se conservó para un procesamiento posterior.

- **Actividad locomotora inducida por el agonista dopaminérgico: SKF-81297.**

Se evaluó la actividad motora inducida por el compuesto SKF-81297 (Sigma-Aldrich, Madrid, España), en ratones D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup> y D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>. Se empleó el test de actividad motora como en los apartados anteriores.

Después de un periodo de habituación para los distintos grupos experimentales, se evaluó la actividad motora basal durante 3-4 días. Al día siguiente, los distintos

grupos recibieron una única inyección de 2.5 mg/kg (i.p.) de SKF 81297 o salino y se depositaron en las distintas cajas de actividad, evaluándose la actividad locomotora durante 60 minutos. Para estudiar el patrón de expresión del gen de inducción temprana, c-fos, los animales tratados se sacrificaron, como se ha descrito en el apartado anterior, al finalizar el experimento.

### **3.8. Estudios de analgesia en ratones WT y KO de receptores dopaminérgicos.**

Para establecer, ante un estímulo nociceptivo térmico, el “intervalo de efecto analgésico” y el “máximo efecto analgésico” del  $\Delta^9$ -THC en los ratones WT y en ratones  $D_1R^{-/-}$  y  $D_2R^{-/-}$ , se realizaron curvas tiempo-respuesta. Los animales de experimentación recibieron una única dosis de 10 mg/kg (i.p.), con el fin de determinar el tiempo transcurrido desde la inyección hasta la aparición de la respuesta biológica y la duración del efecto producido por la droga.

Se determinó el efecto analgésico máximo ante un estímulo nociceptivo térmico mediante el *test de retirada de la cola o test de inmersión de la cola*.

Este test consiste en la introducción del tercio distal de la cola del ratón en un baño de agua caliente a 52°C, hasta que el animal la retira al percibir la sensación dolorosa como consecuencia de la elevada temperatura del agua. El tiempo de reacción (tiempo que tarda en retirar la cola del baño) se expresa en segundos. Se establece un tiempo de corte de 10 segundos para prevenir la aparición de daño tisular.

El grupo experimental de ratones  $D_1$  y  $D_2$  fue sometido al test de inmersión o retirada de la cola, se cronometró el tiempo de reacción en condiciones basales e inmediatamente los animales recibieron una dosis única de THC o solución salina. Se realizaron distintas mediciones durante 4-5 horas a intervalos de 20-30 minutos y, con los datos resultantes, se obtuvo una curva tiempo-respuesta que permitió establecer el intervalo en el que la droga tiene un efecto mayor.

Una vez establecido el intervalo de mayor efecto, en los distintos grupos experimentales de ratones WT y  $D_1R^{-/-}$  y  $D_2R^{-/-}$  se realizó un periodo de habituación. Los animales de experimentación recibieron un tratamiento crónico con THC (10 mg/kg, i.p. o 10 µg, dos veces al día, icv) durante 5 días consecutivos y, paralelamente, se utilizaron grupos control de ratones que recibieron solución salina. Se evaluó el tiempo de reacción en condiciones basales, a continuación recibieron una dosis única diaria de la droga en un volumen equivalente al peso del animal, se evaluó la actividad motora durante 60 min, y posteriormente se sometieron al test de retirada de la cola. El

intervalo de efecto para el THC es amplio y por ello se realizó el test después de la evaluación de la actividad motora.

### **3.9. Estudios de temperatura en ratones WT y KO de receptores dopaminérgicos.**

El efecto en el descenso de la temperatura corporal se determinó midiendo la temperatura rectal en un grupo experimental de ratones WT, D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> y D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>.

La temperatura basal, a tiempo cero, se determinó para cada ratón utilizando un termómetro electrónico digital, acoplado a un sensor rectal flexible (Panlab s.l., Barcelona, España). El sensor se introdujo en el recto del animal al menos durante 5-10 seg antes de registrar la temperatura. Inmediatamente, recibieron una dosis única de THC o solución salina y se realizaron distintas mediciones durante 4-5 horas a intervalos de 20-30 minutos. Con los datos resultantes, se obtuvo una curva tiempo-respuesta que permitió establecer el intervalo en el que la droga tiene un efecto mayor.

Después del periodo de habituación, los animales de experimentación recibieron un tratamiento crónico con THC (10 mg/kg, i.p. o 10 µg, dos veces al día, icv) durante 5 días consecutivos. Paralelamente, se utilizaron grupos control de ratones que recibieron solución salina. Los grupos de animales utilizados para este experimento son los mismos que los utilizados en la evaluación de la actividad motora y en el test de analgesia para el THC. Por ello, después de medir la temperatura basal a tiempo cero recibieron una dosis única diaria de la droga, se evaluó la actividad motora durante 60 min, se sometieron al test de retirada de la cola y, por último, se midió la temperatura rectal puesto que la duración del intervalo de efecto del compuesto es muy amplio.

## **4. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DEL TEJIDO.**

El tejido se procesó en función de las distintas técnicas empleadas: hibridación *in situ*, inmunohistoquímica o estudios de binding de proteínas.

### **4.1. Obtención y procesamiento del tejido para hibridación *in situ* y binding.**

Para los estudios de hibridación *in situ* y binding realizados en este trabajo de investigación, se emplearon ratas de la cepa Wistar y ratones WT, D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> y D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>.

Los animales de experimentación se sacrificaron rápidamente por decapitación y se llevó a cabo la disección y extracción de los cerebros separando los huesos del cráneo

y eliminando las meninges que son capas de tejido conectivo que recubren el cerebro y que al extraerlo pueden dañar el tejido. El cerebro extraído se cubrió con hielo seco en polvo durante 2h para que se congelara de forma homogénea, preservándose con este método los ácidos nucleicos y la morfología celular. A continuación, el cerebro se protegió con parafilm y se almacenó a una temperatura de -80 °C en un ultracongelador durante, al menos, 24h. Después de este proceso, se obtuvieron secciones coronales de 12 µm de grosor en un criostato Leica CM 1900 UV (Leica Microsystem, Barcelona) y se recogieron sobre portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina (Sigma-Aldrich Diagnostics, St. Louis, MO, USA). Este recubrimiento especial permite que el tejido se mantenga adherido. Se dejaron secar durante 30 min aproximadamente y se almacenaron a -80°C hasta su posterior utilización.

#### **4.2. Obtención y procesamiento del tejido para inmunohistoquímica.**

Para los estudios de inmunohistoquímica se emplearon ratas Wistar y ratones WT, D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> y D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>. Con el fin de preservar la morfología y la estructura de las células y los tejidos, se perfundieron los animales con paraformaldehído, dando lugar a uniones inter e intramoleculares en las proteínas del tejido. Además de preservar éste, la solución fijadora previene la pérdida o migración de los antígenos. El procedimiento empleado se describe a continuación:

Los animales de experimentación recibieron una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (Lab. Normon, Madrid, España), anestésico de acción rápida que permite la sedación del animal rápidamente. La dosis administrada del anestésico fue de 200 mg/kg para la rata y de 20 mg/kg para el ratón. Cuando el animal perdió todos sus reflejos, se procedió a su disección empezando por la apertura de la caja torácica, para visualizar el corazón, y eliminar el pericardio. Se inyectó una solución de heparina al 1% directamente en el ventrículo izquierdo para prevenir la formación de coágulos sanguíneos, y se realizó una pequeña incisión en el mismo ventrículo a través de la cual se introdujo una cánula hasta la arteria aorta. A continuación, se realizó una incisión en la aurícula derecha que permitió la apertura del circuito sanguíneo. Al mismo tiempo a través de la cánula comenzó a penetrar la solución fijadora (paraformaldehído 4% en PBS 0.1 M, pH 7.4), con ayuda de una bomba peristáltica en el caso de la rata (V=300-400 ml) y manualmente y mediante jeringa para el ratón (V=30-50 ml). Después se procedió a la decapitación del animal y a la extracción del cerebro fijado. Se sumergió el cerebro en solución fijadora (fase de post-fijación por inmersión) durante un periodo



que puede variar de 2-24 h. Después de la fase de post-fijación, los cerebros se sumergieron en una solución tampón de PB 0.1 M (  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.1 M,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.3 M) con azida sódica 0.02 %.

Se obtuvieron series completas de secciones coronales de 30  $\mu\text{m}$  de grosor en un vibratomo Leica VT 1000S. Los cortes así obtenidos se conservaron en una solución de PB 0.1 M con azida sódica 0.02 % en placas de 12 compartimentos; cada una de las series de tejido, al completo, se depositó en un compartimento individual. Las placas se almacenaron a 4°C hasta su procesamiento posterior.

## 5. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS.

### 5.1. Estudios de hibridación *in situ*.

Los estudios de hibridación *in situ*, consistieron en la hibridación específica de una sonda marcada (fragmento de ARN monocatenario que resulta de la transcripción de un inserto de ADN subclonado en un plásmido) con su secuencia complementaria de ARN mensajero en secciones de tejido, previamente congeladas. Durante la realización de la técnica de hibridación *in situ* hay que tomar una serie de precauciones para prevenir la degradación del ARN, y por ello y para evitar la contaminación con RNAsas se utilizaron guantes durante todo el procedimiento, se autoclavaron todos los recipientes de vidrio utilizados y todas las soluciones acuosas se trataron con un inhibidor de RNAsas, dietilpirocarbonato (DEPC) (USB Corporation, Cleveland, OH, USA).

#### - Ribosondas específicas.

Las ribosondas empleadas en los distintos estudios fueron de ARN mensajero orientadas en dirección 5'→ 3' (antisentido), cuya secuencia nucleotídica es complementaria a la que se encuentra en el tejido estudiado. Las sondas de ARN se obtuvieron mediante transcripción *in vitro* con enzimas ARN polimerasas, a partir de un ADN que se insertó en un vector de transcripción o plásmido que posee los promotores para dichas polimerasas. Los plásmidos se linealizaron con enzimas de restricción y, según el promotor de ARN polimerasa (SP6, T3 o T7), la transcripción se realizó en el sentido del ARN mensajero dando lugar a la sonda sentido, que permitió detectar la señal de fondo o se obtuvieron copias complementarias del ácido nucleico diana, originando la sonda antisentido que nos permitió detectar la señal estudiada en el tejido.

En la reacción de síntesis se incorporaron ribonucleótidos marcados con digoxigenina-11-UTP, molécula de tipo antigénico de origen vegetal extraída de la digital (*Digitalis purpúrea* y *Digitalis lanata*), o ribonucleótidos trifosfato portadores del isótopo radiactivo  $S^{35}$ , emisor de radiaciones  $\beta^-$ .

Se realizaron los experimentos de hibridación *in situ* para el receptor  $CB_1$  simultáneamente con cada uno de los marcadores específicos de las células estriatales: precursor de **encefalina o preproencefalina** (marcador de neuronas de proyección de la vía indirecta), precursor de **sustancia P o  $\beta$ -preprotaquiquina** (marcador de las neuronas de proyección de la vía directa), la enzimas colino acetil transferasa (**ChAT**) y la ácido glutámico decarboxilasa (**GAD-67**) junto con las proteínas **somatostatina y parvalbúmina** como marcadores de los distintos tipos de interneuronas estriatales. Las ribosondas utilizadas fueron las siguientes: Sonda de cRNA de 492 bp complementaria al cADN plasmídico de rata preproencefalina (pro-Enk) (cedido por el Dr. Sabol, Laboratory of Biochemical Genetics, NIH, Bethesda, Maryland, USA); sonda de cRNA de 480 bp complementaria al cADN plasmídico de la  $\beta$ -preprotaquiquina (SP) de rata (cedido por el Dr. James E. Krause, VP-Biochem Neurogen Corp. Branford, USA); sonda de cRNA de 430 bp complementaria al cADN plasmídico de rata somatostatina (SOM) (cedido por la Dra. Cacicedo, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, España), sonda de cRNA de 700 bp complementaria al cADN plasmídico de rata parvalbúmina (PVB) (cedido por el Dr. Berchtold, Institut für Pharmakologie und Biochemie, Universität Zurich, Switzerland), sonda de cRNA de 694 bp complementaria al cADN plasmídico de rata acetilcolina transferasa (ChAT) (cedido por la Dra. Berrard, Centre National De la Recherche scientifique, Hôpital de la Pitié Salpêtrière, Paris, Francia), sonda de cRNA de 326 bp complementaria al cADN plasmídico de rata del ácido glutámico decarboxilasa 67 (GAD67) (cedido por el Dr. Tillakaratne, University of California, Los Angeles, USA), sonda de cRNA de 1619 bp complementaria al cADN plasmídico del receptor  $CB_1$  de humano (cedido por el Dr. A. Santos, Universidad Complutense de Madrid, España) y sonda de cRNA de 250 bp complementaria al cADN plasmídico de rata de tirosina hidroxilasa (TH) (cedido por el Dr. J. Mallet, Hôpital de la Pitié Salpêtrière, Paris, Francia).

- **Síntesis de ribosondas y marcaje.**

Las ribosondas de ARN se sintetizaron a partir de un *template* o molde (plásmido linealizado o producto de PCR purificado con las secuencias de los promotores en sus extremos). Las ribosondas radiactivas se sintetizaron mezclando 1µg del *template* apropiado con 350 µCi de CTPαS [<sup>35</sup>S] (1250Ci/mmol, Dupont, NEN, Boston, MA, USA) y se añadió una mezcla de nucleótidos no marcados a una concentración final de 2 mM (ATP+UTP+GTP) y CTP 5 µM. Además, se añadieron 2u/µl de RNAsin (inhibidor de RNAsas), ditioneitol 10 mM (DTT) para prevenir la oxidación y 1.5-1.7u/µl de la ARN polimerasa correspondiente para la síntesis de la sonda sentido y antisentido. Las ribosondas marcadas con digoxigenina se sintetizaron mezclando 4 µg del *template* apropiado con 2 µl de Dig RNA labeling mix (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany), que contiene digoxigenina-11-UTP y nucleótidos no marcados (CTP, ATP, GTP y UTP), y se añadieron 4 u/µl de RNAsin y 3-3.4 u/µl de la ARN polimerasa correspondiente. La mezcla se incubó en un baño de agua a 37 °C durante 1-2 horas en agitación. Se añadió 1 µg/µl de DNAsa RQI y se mantuvo la mezcla a 37 °C durante 15 min más. La sonda sintetizada se purificó por precipitación con etanol, añadiendo una mezcla de TE (1M pH 8.0), acetato sódico 3M y etanol preenfriado al 100%. Para la sonda marcada con digoxigenina, además se añadió EDTA (200 mM; pH 8.0). Con el fin de aumentar el rendimiento de la precipitación, la mezcla se mantuvo a -70°C durante 1 h. Se centrifugó el tubo eppendorf a máxima potencia a 4°C, eliminando después el sobrenadante y lavando el precipitado con etanol 70% preenfriado. El precipitado se resuspendió en TE con 40 unidades de RNAsin, y en el caso de las ribosondas radiactivas se añadió DTT a una concentración final 10 mM. La actividad específica de las ribosondas radiactivas se cuantificó en un contador de centelleo β, obteniendo el número de cuentas por minuto (cpm) emitidas por 1 µl de la ribosonda.

- **Pretratamientos.**

Se efectuaron una serie de pretratamientos en el tejido, con la finalidad de permitir la accesibilidad de la ribosonda al ácido nucleico complementario, mejorar la señal de hibridación y la relación señal/fondo.

Se llevó a cabo la prehibridación del tejido fresco congelado, almacenado a -80°C. Se eligieron los portas necesarios para el experimento correspondiente y se dejaron

secar a temperatura ambiente (30 minutos-1 hora). La fijación del tejido se realizó mediante inmersión de los portas en una solución de paraformaldehído al 4% en PBS 0.1M/DEPC, con lo que se mejoró la adherencia de la sección de tejido al porta y la eficacia de la hibridación. Después de la fijación, el tejido se lavó 3 veces con PBS 0.1M/DEPC y, a continuación, se realizó la etapa de acetilación para disminuir el fondo de la reacción. Se preparó una solución tampón de trietanolamina 0.1M (TEA pH 8.0) que contenía 2.7 ml de TEA 7.5M stock, 1.8 g de NaCl en 200 ml de agua DEPC, solución a la que se añadió anhídrido acético 0.25%, se agitó y se sumergieron los portas inmediatamente ya que la reacción de acetilación es muy rápida. Dicha reacción permitió transformar las cargas positivas de las proteínas en un grupo amino neutro, para evitar uniones inespecíficas en la reacción de hibridación. Se realizó un lavado con PBS 0.1M/DEPC y se llevó a cabo la deshidratación del tejido con una batería de alcoholes de concentraciones crecientes, 70°C, 80°C, 96°C y 100°C, que impidieron la dilución del tampón de hibridación y de la ribosonda. A continuación, se llevó a cabo la deslipidación del tejido, para aumentar la penetrabilidad de los distintos compuestos, y posteriormente se rehidrató el tejido con alcoholes de 100°C y 96°C. Después de este proceso, los portas se dejaron secar a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora.

- **Hibridación.**

La etapa de hibridación permitió que la ribosonda se uniera a la secuencia complementaria que se encuentra en el tejido, y de este modo se determinó la localización del ARN mensajero que codifica el mensaje para la síntesis proteica. Las sondas de ARN dieron lugar a híbridos muy estables con un gran número de puentes de hidrógeno.

En los experimentos de hibridación *in situ* sencilla, se utilizó una ribosonda radiactiva individual. Los estudios de hibridación *in situ* doble se llevaron a cabo con una ribosonda radiactiva y otra marcada con digoxigenina-UTP. La ribosonda radiactiva se diluyó en una solución de hibridación hasta alcanzar una concentración de 60.000-100.000 cpm/μl y la ribosonda marcada con digoxigenina se diluyó 1:100.

Se preparó un tampón de hibridación stock constituido por los siguientes componentes:

- Formamida desionizada 50% (Sigma-Aldrich). La formamida disminuye hasta un 50% la temperatura de hibridación, debido a que provoca la apertura de las dobles hélices o estructuras terciarias de los ácidos nucleicos y, por tanto, preserva mejor la morfología del tejido.
- Sulfato de dextrano 10% (Amersham-Pharmacia). Su presencia disminuye el volumen “relativo” en el que se lleva a cabo la reacción de hibridación, ya que este polímero absorbe agua y, por consiguiente, aumenta la eficacia de la hibridación y acelera la reacción.
- Solución Denhardt's 1x (Amersham-Pharmacia). Evita el posible fondo saturando las uniones inespecíficas por competición con las macromoléculas.
- Solución de Tris 20 mM, EDTA 5 mM y NaCl 0.3 M.

El tampón final de hibridación incluía los siguientes componentes:

- Tampón de hibridación stock 84%.
- Tiosulfato sódico 0.1% y SDS 0.1%.
- Ditiotreitól 10 mM (DTT). Se utilizó como antioxidante para las sondas marcadas con S<sup>35</sup>.

Dicho tampón de hibridación se mezcló con las ribosondas específicas y con una mezcla de RNA mix, constituida por ADN de esperma de Salmón (100µg/ml), RNA total de levadura tipo XI (250µg/ml) y tRNA de levadura (250µg/ml). La función de estos compuestos es la saturación de las uniones inespecíficas de tipo proteico por competición, motivo por el cual se encuentran a una concentración elevada.

El volumen total de la mezcla de hibridación fue de 90 µl/porta. Se preparó una cámara húmeda con una mezcla constituida por 4x SSC (citrato sódico salino) (0.15 M NaCl, 15 mM citrato sódico) y formamida desionizada, y se colocaron los portas sobre una rejilla para evitar el contacto con el medio líquido de la cámara. La caja de hibridación se depositó durante 6-12 horas en una estufa con humedad mantenida y a una temperatura de hibridación específica para cada ribosonda que osciló entre 50-65°C.

- **Posthibridación.**

Después de la etapa de hibridación, se realizó una etapa de post-hibridación, cuya finalidad fue la eliminación de uniones inespecíficas de la ribosonda que pueden dar lugar al fondo y enmascarar así las uniones específicas. Se realizaron una serie de lavados en condiciones astringentes de temperatura, fuerza iónica y duración, que permitieron la eliminación de las uniones inespecíficas y el mantenimiento de las específicas (más estables). Las condiciones empíricas determinan la mejor opción, en cada caso, para eliminar la señal de fondo.

Los portas se lavaron con una solución de 4x SSC, 2x SSC a temperatura ambiente o 1x SSC a 70°C, en función de la ribosonda empleada. Después, se trataron con una solución de RNasa A (200 µg/ml), durante 45 min a 37°C, y se lavaron con un tampón para RNasa A durante 15 min. Posteriormente se realizaron tres lavados de 5 min con concentraciones decrecientes de sales de sodio y citrato (1x SSC, 0.5x SSC, 0.1x SSC). Por último, se realizaron dos lavados de 30 min con 0.1x SSC a 65 °C y otro a temperatura ambiente durante 5 min.

- **Revelado.**

En los estudios de hibridación *in situ* sencilla se detectó únicamente la ribosonda radiactiva mediante autorradiografía, utilizando películas con una emulsión fotográfica sensible a la radiación emitida por el <sup>35</sup>S. Los portas se dejaron secar al aire durante una noche. Se colocaron en cassettes a temperatura ambiente y en oscuridad, exponiéndolos durante 3-7 días a un Hyperfilm βMax (Amersham Pharmacia Biotech, Barcelona, España), constituido por una emulsión sólida. En el mismo cassette se expusieron estándares comerciales con niveles de radiactividad conocida (<sup>14</sup>C-standards ARC 146A, ARC 146D, American Radiolabeled Chemicals, Inc, MO, USA) que permitieron elaborar una curva patrón entre los valores de densidad óptica y la concentración de radiactividad. Con estos valores conocidos se obtuvo una equivalencia entre valores de densidad óptica y uCi/g. Las películas se sometieron a una primera etapa de revelado con D-19 (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA), en la que se produce el paso de las sales de bromuro de plata a plata metálica modificada por el efecto de la radiación. A continuación se llevó a cabo la etapa de fijación, en la que se produjo la disolución de las sales restantes. Por último, se realizó la etapa de secado.

En los estudios de hibridación *in situ* doble, después de la posthibridación, los portas se sometieron a una serie de tratamientos para detectar la ribosonda marcada con

digoxigenina-UTP mediante inmunocitoquímica con un anticuerpo antidigoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina. Los portas se sumergieron en una solución de Tris buffer, TB I (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5), y a continuación en una solución con suero de cabra (3%) y Tritón x-100 (0.3%, Sigma-Aldrich). Se incubaron con el anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (1:1000, Roche Molecular Biochemicals), en cámara húmeda a 4°C durante 5 a 14 horas, dependiendo de la ribosonda estudiada. A continuación, se lavaron con TB I y se sumergieron en Tris buffer, TB III (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.5). Por último, se incubaron en oscuridad con una mezcla de los cromógenos, nitroblue tetrazolium (NBT, 0.34 mg/ml) y 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP, 0.175 mg/ml) en TB III. Con el sistema NBT/BCIP precipitan dos moléculas por cada molécula de fosfatasa alcalina. La reacción es de óxido-reducción (oxidación del BCIP y reducción del NBT), que se traduce en dos precipitados de color violeta insolubles en agua, pero solubles en etanol. Dicha reacción se monitorizó al microscopio óptico hasta obtener un resultado óptimo, se detuvo con un tampón TB III y los portas se sometieron a una ligera deshidratación con agua y etanol al 70 % durante 2 min. Después de la exposición al Hyperfilm  $\beta$ Max a lo largo de 3-7 días, se seleccionaron los portas para microautorradiografía (técnica que permite visualizar individualmente los granos de plata obteniendo una resolución celular). Los portas se recubrieron con una emulsión fotográfica nuclear líquida LM1 (Eastman Kodak, Amersham) diluída en una proporción 3:1 v/v con agua destilada y 0.1% de glicerol. Todo el proceso se realizó en un cuarto oscuro con luz inactiva, y una vez aplicada la emulsión los portas se secaron durante un tiempo variable (5 h - 1 noche a temperatura ambiente) en una rejilla vertical, asegurando la homogeneidad de la capa de emulsión. Posteriormente se almacenaron, a una temperatura de 4°C, en cajas herméticas protegidas de la luz y con silicagel. El tiempo de exposición varió dependiendo de la ribosonda estudiada. El revelado se realizó en un intervalo de 2-6 semanas y en las mismas condiciones que las películas de autorradiografía, en cuarto oscuro y con luz inactiva. Finalmente, las secciones de tejido reveladas se cubrieron con un medio acuoso, Cytoseal 60 (Electron Microscopy Sciences, Washington, EEUU) y se almacenaron a temperatura ambiente para su posterior cuantificación.

- **Cuantificación.**

La cuantificación de los ácidos nucleicos por célula se llevó a cabo mediante el conteo del número de granos de plata por célula, método que si bien no permite la cuantificación absoluta, porque un ARNm no se corresponde a un grano de plata, nos permitió realizar un análisis semi-cuantitativo muy exhaustivo. En los estudios de hibridación *in situ* sencilla, las películas se analizaron con un sistema de análisis de imagen, Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MD, EEUU). Este método permite identificar la localización macroscópica de la señal y su cuantificación a nivel tisular. La densidad de la señal se determinó por la medida de la densidad óptica en autorradiogramas, que es proporcional a la radiación emitida y, por tanto, al número de híbridos formados. La elaboración de una curva patrón entre los valores de densidad óptica y la concentración de radiactividad (uCi/g), permitieron establecer las equivalencias para los valores obtenidos.

En los estudios de hibridación *in situ* doble se procedió a un análisis cuantitativo del ARNm del receptor CB<sub>1</sub> en cada una de las poblaciones neuronales. Se realizó la cuantificación del número de granos de plata presentes en el soma neuronal de la célula (nº granos de plata/1000  $\mu\text{m}^2$ ). Para dicho estudio se utilizó el sistema de análisis de imagen (Qwin 500, Leica Microsistemas SA, Barcelona, España). Los granos de plata que constituyen el fondo, se cuantificaron en el cuerpo calloso utilizando muestras circulares de 250  $\mu\text{m}^2$  y eligiendo un área semejante al de las células marcadas con digoxigenina.

Paralelamente, se realizó un estudio de coexpresión del receptor CB<sub>1</sub> y las distintas poblaciones de neuronas estriatales y se llevó a cabo la cuantificación del número de células que coexpresan con dicho receptor. El estudio se llevó a cabo utilizando microscopía óptica y se realizaron fotogramas con un aumento 40x para las neuronas de proyección estriatal: neuronas de la vía directa o dinorfinérgicas y neuronas de la vía indirecta o encefalinérgicas. Se emplearon tres animales, cuantificando dos secciones coronales por animal y un mínimo de 2000-2500 neuronas por hemisferio cerebral y por población neuronal, estableciendo un porcentaje de coexpresión del receptor CB<sub>1</sub> con cada una de las poblaciones estudiadas.



- **Análisis estadístico.**

En este caso, se cuantificaron los granos de plata por neurona y por 1000  $\mu\text{m}^2$  en cada población de neuronas estriatales, para determinar si existían diferencias en la expresión del receptor CB<sub>1</sub>. El análisis estadístico se realizó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con un nivel significativo del 5 %, seguido de una t de Student y del test post-hoc de Bonferroni-Dunnet para realizar comparaciones de pares múltiples.

**5.2. Estudios inmunohistoquímicos.**

Las técnicas inmunocitoquímicas nos permiten demostrar *in situ* la presencia de una sustancia o estructura celular o tisular con capacidad antigénica. La reacción inmune consiste en la unión a dichas estructuras de anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos contra determinantes antigénicos, formando un complejo antígeno-anticuerpo. Los complejos así formados se pueden detectar mediante el uso de colorantes fluorescentes (técnicas inmunofluorescentes) o de reacciones enzimáticas (técnicas inmunoenzimáticas). Las técnicas inmunohistoquímicas son técnicas de inmunolocalización que utilizan un enzima como trazador del marcaje. En la parte final de la reacción se añade el sustrato de la enzima y al reaccionar con dicho sustrato interacciona con un cromógeno, dando lugar a un precipitado insoluble y coloreado que permite ver la reacción antígeno-anticuerpo. En la técnica de inmunoperoxidasa, la enzima peroxidasa, obtenida de rábano picante, se utiliza como trazador enzimático (Peinado y cols, 1996 Libro pag 143).

- **Anticuerpos primarios.**

En los distintos estudios inmunohistoquímicos se utilizaron los siguientes anticuerpos policlonales desarrollados en conejo:

- Anti-CB<sub>1</sub>. Anticuerpo contra el receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> de rata (Howlett y cols., 1998). Dilución 1:500.
- Anti-c-fos (Ab-5). Anticuerpo contra el gen de inducción temprana c-fos. Dilución 1:15000. Calbiochem
- Fos B/ $\Delta$  Fos B. Anticuerpo contra el gen de inducción tardía Fos B. Dilución 1:30000. Santa Cruz Biotechnology, California

- Anti-Dinorfina B. Anticuerpo contra el péptido Dinorfina B (cedido por el Dr. Watson). Dilución 1:10000.
- Anti-encefalina. Anticuerpo contra el péptido encefalina. Dilución 1:1000. Instar Corporation, Stillwater, MN, EEUU.

Los anticuerpos primarios utilizados se diluyeron en una solución tampón compuesta por: PBS 0.1M con tritón X-100 (Sigma) al 0.1 % azida sódica y 1% de suero normal de cabra (NGS).

- **Anticuerpos secundarios.**

Se utilizó un único anticuerpo secundario biotinilado, anti-conejo Ig G (H+L) hecho en cabra (Vector laboratories, Inc, CA, USA), diluido en PBS 0.1M con tritón X-100 y 1% de suero normal de cabra (NGS). La dilución utilizada fue 1:500 en todos los estudios realizados.

- **Inmunohistoquímica.**

Se aplicaron técnicas inmunohistoquímicas sencillas y de doble marcaje para la detección de antígenos. Los experimentos se realizaron en series rostrocaudales de secciones coronales flotantes, según el método inmunocitoquímico estándar de la avidina-biotina (Moratalla y cols., 1996; Rivera y cols., 2002a). Las técnicas citadas se emplearon con el fin de determinar la distribución, densidad y coexpresión de las distintas proteínas estudiadas.

***Inmunohistoquímica sencilla***

El protocolo utilizado para el desarrollo de esta técnica fue el descrito previamente en Rivera y cols., 2002a, b. En primer lugar, las secciones de tejido almacenadas en placas se lavaron con una solución tampón fosfato,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.1 M,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.3 M y NaCl 0.15 M con 0.2% de Tritón X-100 (PBST 0.1M), exceptuando la inmunohistoquímica para encefalina en la que no se utilizó tritón en ningún punto del proceso. A continuación, las secciones se trataron con  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 3% en PBST para eliminar la peroxidasa endógena que contiene el tejido, con el fin de evitar que interfiera en la etapa del revelado. Después de lavar las secciones con PBST, el siguiente paso fue el bloqueo de los sitios de unión inespecíficos con suero del animal en el que se generó el anticuerpo secundario, utilizándose en todos los experimentos suero normal de cabra (NGS) al 5% o 10% durante 1-2 horas. La incubación con el anticuerpo primario se

realizó en PBST con un 1% de NGS y 0.1 % de azida sódica, variando las condiciones de incubación que dependieron del anticuerpo primario:

- |                        |       |   |
|------------------------|-------|---|
| ➤ Anti-CB <sub>1</sub> | ————→ | 3 noches a 4°C  |
| ➤ Anti-c-fos (Ab-5)    | ————→ | 1 noche a 4°C   |
| ➤ Fos B/Δ Fos B        | ————→ | 1 noche a 4°C + 1 noche a temp ambiente<br>1 noche a 4°C + 2 noches a temp ambiente |
| ➤ Anti-Dinorfina B     | ————→ | 2-3 horas a temperatura ambiente<br>+ 3 noches a 4°C                                |
| ➤ Anti-encefalina      | ————→ | 1 noche a temperatura ambiente  |

A continuación se realizó la incubación con el anticuerpo secundario, anti-IgG de conejo biotinilado diluido 1:500, durante 1-2 horas y a temperatura ambiente. Las secciones se sometieron a una serie de lavados con PBST, y en la etapa siguiente se incubaron en una solución de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (HPR) a una dilución 1:5000 en PBST (Zymed Laboratorios Inc., South San Francisco, CA, USA), para amplificar la señal. La incubación con estreptavidina se realizó a temperatura ambiente y con una duración de 1 hora, puesto que si se prolonga puede aumentar el fondo. Las secciones se lavaron con PBS durante 30 minutos y, finalmente, se llevó a cabo la etapa de revelado de la actividad peroxidasa con tetrahidrocloro de 3-3'diaminobenzidina (DAB, concentración final 0.2 mg/ml, Sigma) en PB 0.1 M y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.002% que es el sustrato de peroxidasa. La reacción se intensificó con sulfato de níquel amonio (II) (NAS) a una concentración final de 0.8 mg/ml (Carlo Erba Reagenti, Milán, Italia), obteniéndose de esta forma un precipitado de color azul-violeta que nos permitió identificar las distintas proteínas inmunorreactivas en estudio. Por último, las secciones de tejido ya teñidas se lavaron con PB 0.1M para eliminar los restos adheridos y se montaron sobre portaobjetos recubiertos con gelatina. El tejido se dejó secar al aire y se deshidrató con una batería de alcoholes de graduación creciente (70°, 80°, 96°, 100°); por último, se aclararon con xileno y se cubrieron con un medio de montaje como DPX o Permount.

### ***Inmunohistoquímica doble***

El protocolo utilizado en los dobles marcajes fue descrito previamente en los trabajos realizados por Moratalla y cols, 1996 y Rivera y cols., 2002 a, b. Los dobles marcajes se utilizaron para poner de manifiesto la coexpresión del gen de inducción temprana c-fos con los péptidos dinorfina y encefalina. En este caso, se reveló el primer anticuerpo con DAB-NAS, dando lugar a un precipitado azul-violeta, y a continuación, con una serie de tratamientos adicionales, se reveló el segundo anticuerpo con DAB solamente, dando lugar a un precipitado de color marrón e insoluble en alcohol.

Después de revelar el primer anticuerpo como se ha descrito en el apartado anterior, se incubó el tejido en una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.6% en PB 0.1M durante 45 minutos. A continuación, se bloquearon los restos de avidina-biotina de la reacción anterior con Avidin/Biotin blocking Kit (Vector laboratories), incubando por separado con una concentración de avidina y biotina de 6 µl/ml durante 30 minutos. Después del bloqueo, se llevó a cabo la inmunohistoquímica para el segundo anticuerpo como se ha descrito en el apartado anterior. Para diferenciar el marcaje del primer y del segundo anticuerpo, la etapa de revelado de éste se realizó únicamente con DAB obteniéndose un precipitado de color marrón y poniendo de manifiesto la coexpresión o no coexpresión de los distintos antígenos presentes en el tejido. Finalmente, las secciones de tejido doblemente marcadas se lavaron con PB 0.1 M, se montaron sobre portaobjetos gelatinados, se deshidrataron y cubrieron con medio de montaje.

### **- Cuantificación.**

Se realizó la cuantificación del gen de inducción temprana c-fos en el estriado medio y núcleo accumbens de ratones D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup> y D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> tratados con cocaína o SKF 81297. Se cuantificó el número de núcleos de c-fos por milímetro cuadrado (nº núcleos/mm<sup>2</sup>) en cada uno de los grupos de animales tratados, con el sistema de análisis de imagen AIS (Imaging Research, Linton, Inglaterra). Se realizaron fotografías con un aumento 10x del estriado y núcleo accumbens de los distintos grupos experimentales y se analizaron por el sistema AIS, estableciendo una relación entre el número de núcleos detectados por el programa y el área estudiada.

- **Análisis estadístico.**

El análisis estadístico de los núcleos de c-fos, realizado por análisis de varianza de dos vías (ANOVA) y t de Student, permitió establecer si entre los distintos grupos de animales de cada tratamiento existían diferencias significativas.

**5.3. Estudios de binding del receptor  $\mu$  opioide.**

Se llevaron a cabo estudios de autorradiografía del receptor  $\mu$  opioide, que permitieron visualizar la expresión del receptor en cerebro de rata y compararla con la expresión del ARN mensajero del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>. Para ello, se emplearon secciones coronales de tejido adyacentes a las secciones utilizadas para la detección del ARN mensajero del receptor CB<sub>1</sub> mediante hibridación *in situ*.

El experimento se realizó siguiendo el protocolo descrito por Moratalla y cols., 1992. Para su desarrollo se utilizó, como ligando específico del receptor  $\mu$  opioide, naloxona tritiada (Nx-<sup>3</sup>H, actividad específica 54.0 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech, Barcelona) a una concentración de 2.5 nM. Las secciones coronales de tejido, previamente cortadas en criostato con un grosor de 12  $\mu$ m, como se detalla en el apartado 4.1, se secaron al aire durante unos 30 minutos. En primer lugar, se hizo una preincubación con una solución de Tris-HCl 50 mM pH 7.4 a 4°C. Después se realizó un binding específico de naloxona con el que se determinó la unión total al receptor. Las secciones de tejido se incubaron entonces en la solución anterior con 2.5 nM de <sup>3</sup>H-Nx a 4°C durante 60 minutos. Paralelamente y con las mismas condiciones se llevó a cabo un binding inespecífico con el ligando no marcado, siendo la concentración de naloxona fría 1  $\mu$ M, que desplazó el ligando marcado y nos permitió determinar el marcaje inespecífico. Se realizaron tres lavados de 20 segundos con PBS 50 mM y agua destilada y, finalmente, se dejaron secar al aire. Las secciones se expusieron a una película sensible a la emisión de tritio [<sup>3</sup>H]Hyperfilm (Amersham, Iberica, España) a lo largo de 6 semanas, obteniendo así imágenes de la unión al receptor.

#### **5.4. Estudios de Western Blot.**

La fosforilación de ERK se estudió en ratones  $D_2R^{+/+}$  y  $D_2R^{-/-}$  tratados con cocaína aguda como se ha descrito anteriormente. En el proceso de Western Blot, los extractos de proteínas del estriado de los ratones tratados con salino o cocaína aguda se procesaron como se ha descrito en trabajos anteriores (Grande y col., 2004; Pavón y cols., 2006). Las proteínas (20  $\mu$ g) se resuspendieron con SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La inmunodetección se realizó con un anticuerpo primario policlonal de conejo (dilución 1:1000) frente a la forma fosforilada de ERK1/2 (Cell Signalling Technology, Beverly, MA, USA). Las bandas se visualizaron por quimioluminiscencia (ECL, Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra).



## ***RESULTADOS***



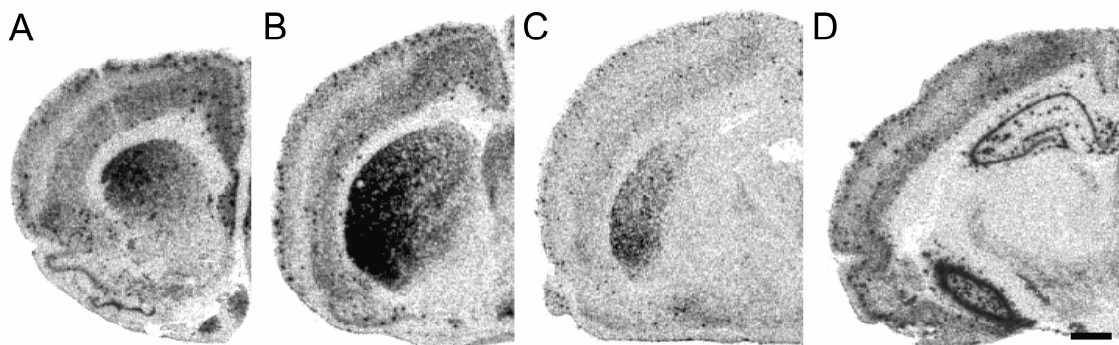


## 1. DETERMINACIÓN DEL SUSTRATO ANATÓMICO, A NIVEL CELULAR, DE LA INTERACCIÓN DEL SISTEMA DOPAMINÉRGICO CON EL SISTEMA CANNABINOIDE.

Para analizar la posible interacción entre estos dos sistemas, se estudió la distribución anatómica del receptor CB<sub>1</sub> en relación al sistema dopaminérgico mediante **hibridación *in situ* sencilla o doble e inmunohistoquímica**. Estos estudios se detallan a continuación.

### 1.1. Expresión del ARN mensajero del receptor CB<sub>1</sub> en los ganglios basales de rata.

Se llevaron a cabo estudios de distribución anatómica y densidad del ARNm para el receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> en cerebro de rata, mediante la técnica de *hibridación in situ* sencilla. La evaluación de los autorradiogramas resultantes de los experimentos permitió establecer el patrón característico de distribución del ARNm del receptor CB<sub>1</sub>. El CB<sub>1</sub> se expresa principalmente en estriado, hipocampo y corteza. La intensidad de la señal fue mayor en estriado y menor en hipocampo y corteza. Se observó marcaje en otras estructuras cerebrales, pero con menor intensidad (Fig. 9).



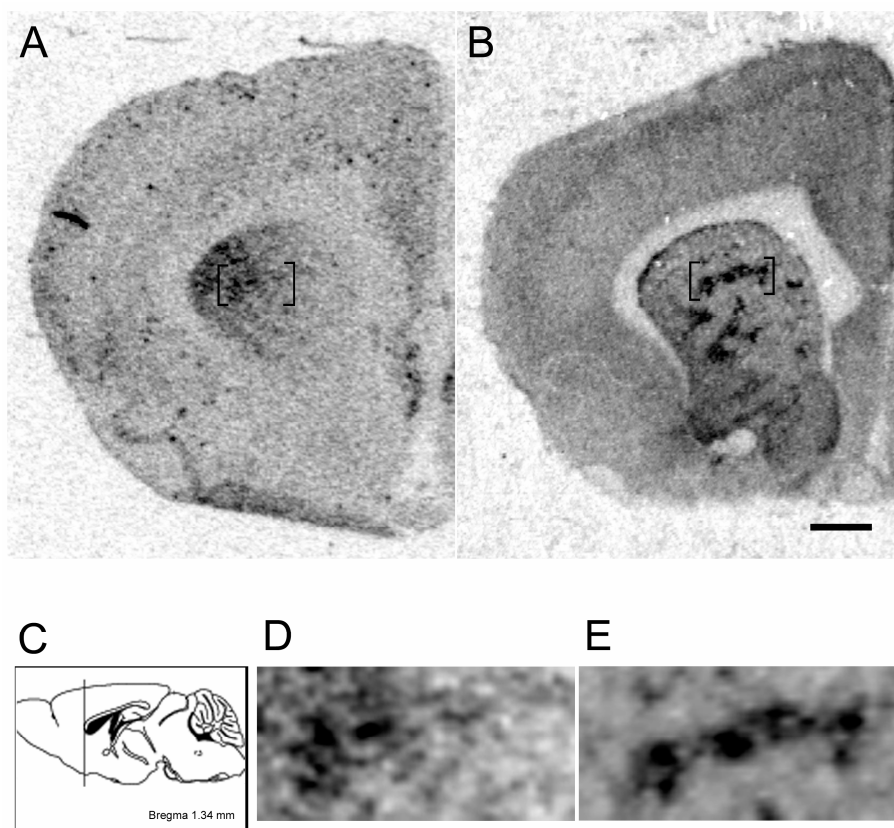
**Figura 9. Distribución del ARNm del receptor CB<sub>1</sub> en cerebro de rata.** Las imágenes autorradiográficas muestran el patrón de expresión del ARNm del receptor CB<sub>1</sub> en la región rostral (A), media (B), caudal (C) del estriado y en el hipocampo (D). Barra de calibración = 1 mm.

- **Estriado.**

Las imágenes obtenidas demostraron que existe una expresión muy elevada del ARNm del receptor CB<sub>1</sub> en la parte dorsolateral del caudado putamen (Cpu), tanto a nivel rostral como a nivel medio, y en las áreas ventrales (Fig 9A, B; 10A y 11A). Se observó un gradiente de expresión que aumentó gradualmente desde la región media del estriado hacia la región lateral, donde presentó mayor intensidad.

En los portas procesados para microautorradiografía, donde se visualizan individualmente los granos de plata, la señal de hibridación se localizó principalmente en las neuronas estriatales de tamaño medio. La intensidad de señal en las neuronas de las distintas regiones del estriado, se correspondió con los resultados observados en los films autorradiográficos. Las neuronas de la parte más dorsal y lateral del estriado rostral y medio presentaron una gran cantidad de granos de plata por célula. El número de estos granos descendió gradualmente hacia la región ventral del estriado. Los resultados obtenidos demuestran que, aunque el mensajero se encuentra ampliamente distribuido en el estriado, existe una mayor concentración en la zona lateral. Además, existen agregados celulares, que podrían pertenecer a los estriosomas, en los que la intensidad de señal fue mayor que en el resto (matriz estriatal) (Fig 10). Caudalmente, podemos observar que el mensajero se expresa con mayor intensidad en la parte ventral que en la parte dorsal del estriado. En el núcleo accumbens, la expresión del ARNm del receptor CB<sub>1</sub> fue menor que en el estriado.

La cuantificación de las imágenes obtenidas por autorradiografía revelan que la densidad de expresión varía en las distintas regiones estriatales (Tabla I). Los estudios de cuantificación se realizaron a lo largo del eje rostrocaudal en secciones rostrales, medias y caudales, dividiéndose el estriado en cuatro cuadrantes: dorsolateral (DL), dorsomedial (DM), ventrolateral (VL) y ventromedial (VM). Los datos de densidad óptica indican que en la región rostral la expresión del ARNm del receptor CB<sub>1</sub> fue más elevada dorsolateralmente. En el estriado medio, la expresión del mensajero fue mayor lateralmente, tanto en la región dorsal como en la región ventral. Caudalmente, los niveles de expresión fueron más elevados en la región ventral que en la dorsal.



**Figura 10. Distribución de los receptores CB<sub>1</sub> y  $\mu$  opioide en el estriado de rata.** A y B. Secciones coronales adyacentes de cerebro de rata que ilustran la distribución del ARN mensajero del receptor CB<sub>1</sub> en comparación con la distribución del receptor opioide  $\mu$ , marcador de los estriosomas. C. Plano del atlas de Paxinos al que se corresponden las secciones fotografiadas. D y E. Fotografías ampliadas de A y B. Obsérvese la correlación anatómica entre la mayor expresión del receptor CB<sub>1</sub> (A y D) y los estriosomas (B y E). Barra de calibración = 1 mm.

#### - Corteza.

En corteza existen algunas células que expresan el ARNm del receptor CB<sub>1</sub>, con una elevada cantidad de mensajero dando lugar a un marcaje muy intenso. En corteza piriforme, la mayoría de las células expresan el receptor y se observa, también en este caso, un marcaje muy intenso.

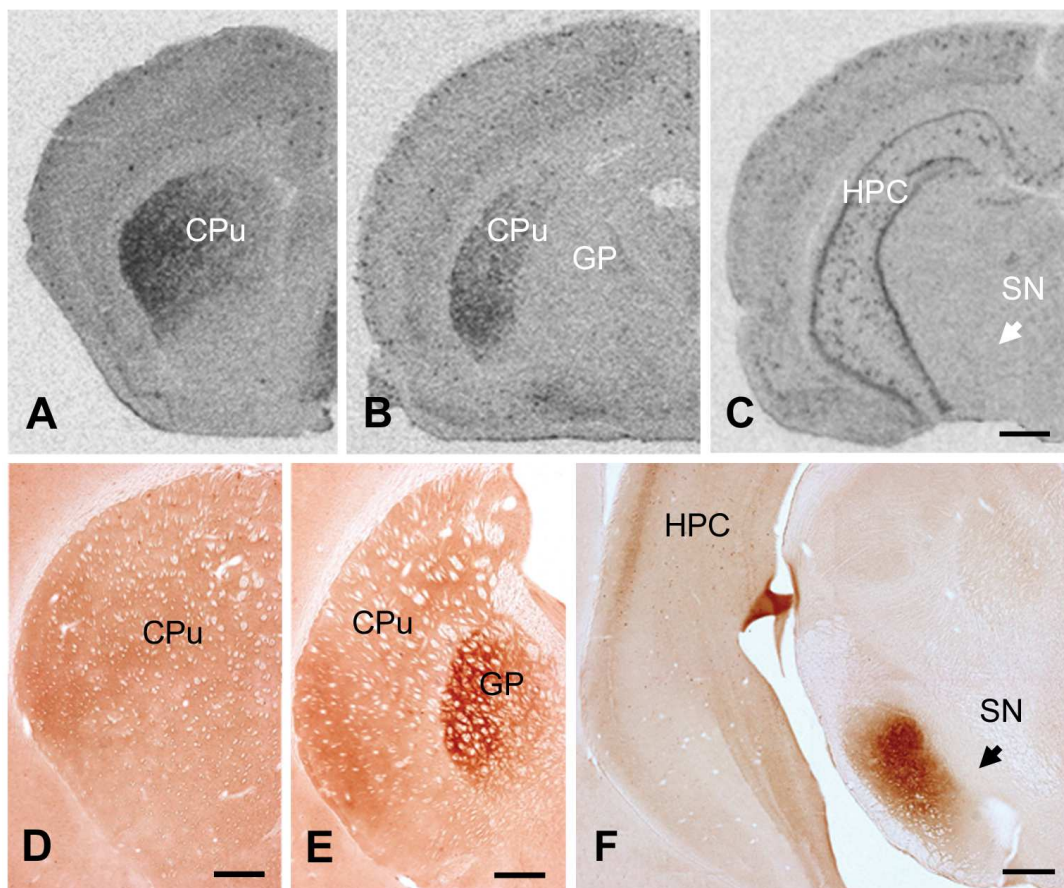
- **Hipocampo.**

En el hipocampo (HPC) (Fig. 11C), el mensajero del receptor CB<sub>1</sub> se expresa con un patrón muy semejante al de corteza, existiendo pocas células que lo expresan aunque con cantidades elevadas de mensajero.

- **Otras áreas cerebrales.**

En diferentes áreas cerebrales, como globo pálido (GP), sustancia negra (SN) (Fig. 9C, D; 11B, C) y área tegmental ventral, no se detectó marcaje para el mensajero del receptor CB<sub>1</sub>, indicando que las células de estas áreas no sintetizan dicho receptor. Sin embargo, existen áreas como el núcleo lateral del septo o la banda diagonal ventral cuyas células sí expresan el receptor.

En la sustancia negra no se detectó señal radioactiva para el ARNm del receptor CB<sub>1</sub>, ni en la parte reticular ni en la compacta.



**Figura 11. Secciones coronales de cerebro de rata procesadas mediante hibridación *in situ* (A-C) e inmunohistoquímica (D-F) para el receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>. A y D, nivel rostral de CPu; B y E, nivel caudal de CPu; C y F, SN. Nótese los diferentes gradientes de intensidad en el Cpu y la carencia de ARNm del receptor CB<sub>1</sub> y su intensa inmunorreactividad en GP y SN. Barras de calibración = 1 mm en A-C; 500 µm en D-F.**

Tabla I. Densidad óptica del ARN mensajero del receptor CB<sub>1</sub>

Sección coronal	Estriado dorsal		Estriado ventral	
	DM	DL	VM	VL
Rostral	74 ± 3.53	109 ± 1.86*	52 ± 5.36	
Medial	82 ± 9.68	129 ± 7.81*	65 ± 12.67	123 ± 4.32*
Caudal	85 ± 2.33 #		115 ± 1.67*#	

Valores medios de densidad óptica ± SEM cuantificados por análisis densitométrico en autorradiogramas de hibridación *in situ* (n= 6). \* p< 0.005 comparado con otras áreas en la misma sección. # p< 0.05 comparado con la región rostro-medial. Student-Newman-Keuls.

## 1.2. Inmunorreactividad del receptor CB<sub>1</sub> en los ganglios basales de rata.

Una vez realizado el estudio de la expresión del mensajero del receptor CB<sub>1</sub>, analizamos la distribución de la proteína mediante **técnicas inmunohistoquímicas**, en el estriado y en los núcleos diana de las proyecciones estriatales, globo pálido y sustancia negra (Fig. 11 D-F).

La evaluación de los resultados permitió establecer que la señal inmunorreactiva se distribuye, principalmente, en estriado, globo pálido y sustancia negra, aunque la expresión de la proteína en estriado fue más baja que en el resto.

### - Estriado.

En el CPu, la intensidad de la señal inmunorreactiva presentó niveles muy bajos. Los gradientes mediolateral y dorsoventral, aunque presentes y en paralelo con el gradiente del ARNm, no resultaron muy marcados (Fig 11D y E; comparar con fig 11A y B, respectivamente). Si bien todo el estriado presentó una inmunorreactividad moderada, no se pudieron definir somas celulares claramente marcados. Se detectó un pequeño contraste entre los cuerpos celulares, con un marcaje débil, y el neuropilo que los rodea. Además, se observaron haces de fibras no marcados en el CPu.

- **Globo pálido.**

En el globo pálido se observaron fibras inmunorreactivas para el receptor CB<sub>1</sub>, marcadas con gran intensidad, que presentaron un gradiente mediolateral, destacando en la parte lateral un marcaje más intenso (Fig 11E).

- **Sustancia negra.**

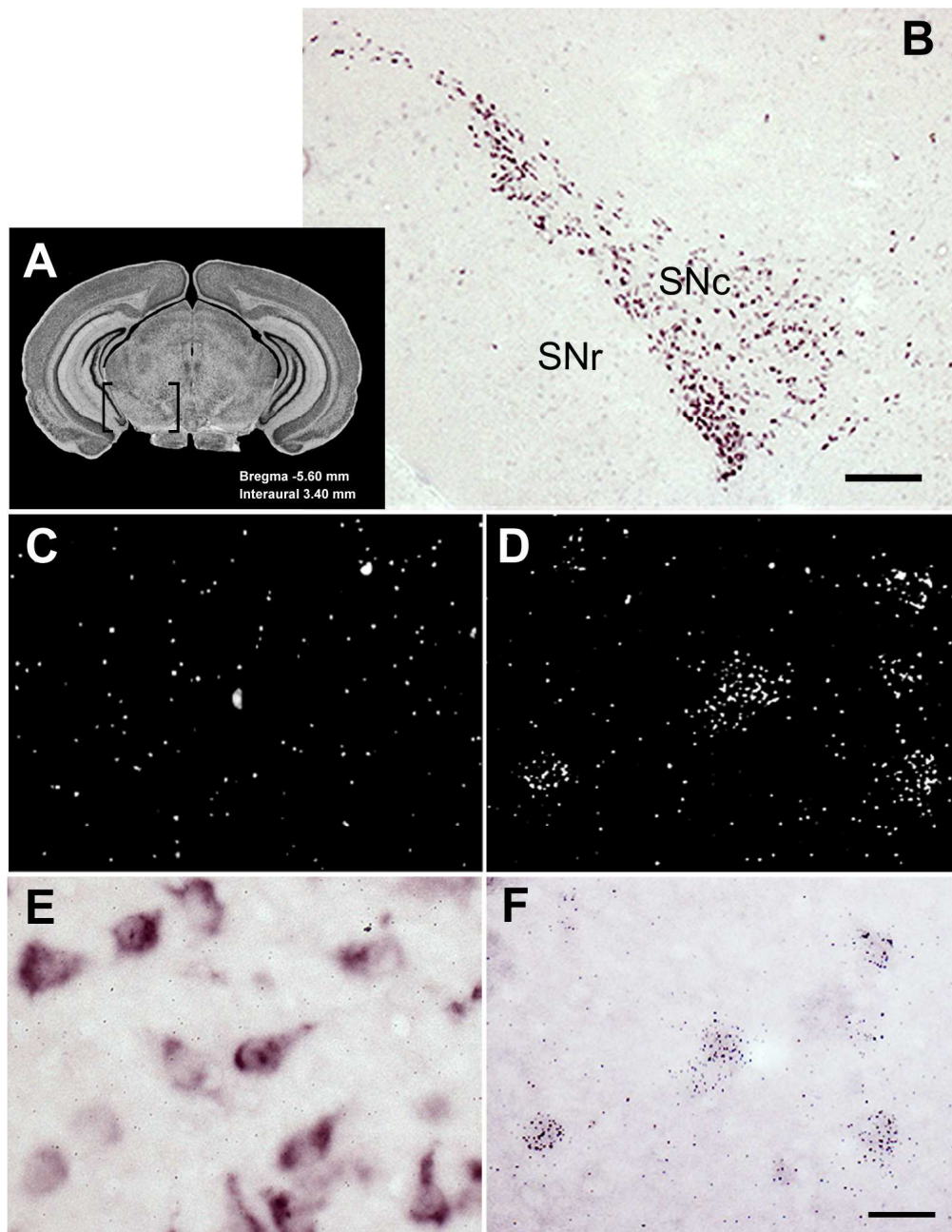
En esta estructura no se manifestaron cuerpos celulares inmunoreactivos para el receptor CB<sub>1</sub>, si bien en la sustancia negra reticular (SNr) se observaron fibras intensamente marcadas (Fig. 11F). En la parte dorsolateral se constató un marcaje muy elevado, mientras que en las regiones ventromedial y dorsomedial se observó un descenso gradual en la intensidad de marcaje.

Para confirmar que en la sustancia negra compacta no existe coexpresión de receptores CB<sub>1</sub> y TH, se realizó un estudio de **hibridación *in situ* doble** con la ribosonda del receptor CB<sub>1</sub>, marcada con <sup>35</sup>S-CTP, y la ribosonda de la tirosina hidroxilasa (TH) marcada con digoxigenina-UTP (el ARNm de la tirosina hidroxilasa se expresa específicamente en las células que forman la parte compacta de la sustancia negra).

En las neuronas de SNc se detectó la expresión del mensajero de tirosina hidroxilasa con un precipitado de color violeta, pero no se detectó señal para el mensajero del receptor CB<sub>1</sub> (granos de plata) (Fig. 12E). Se estudiaron, al microscopio, las secciones de campo oscuro, confirmandose la ausencia de granos de plata en las neuronas TH-positivas (Fig 12C). Las mismas secciones se analizaron como control positivo de la señal de hibridación del receptor CB<sub>1</sub>, donde las neuronas del hipocampo expresaron intensamente el ARNm del receptor CB<sub>1</sub> (Fig 12D y F). Con estos resultados, demostramos que no existe co-expresión entre las neuronas tirosina hidroxilasa positivas y las neuronas que expresan el receptor CB<sub>1</sub>, por tanto no existe expresión del receptor CB<sub>1</sub> en las neuronas de la SN.

Con el fin de investigar si la falta de expresión del mensajero en estos núcleos se debe a niveles de expresión del receptor CB<sub>1</sub> por debajo de los niveles de detección, algunos portas del experimento anterior se mantuvieron expuestos durante mas de tres meses a una película radiosensible. En estas condiciones, tampoco se observó marcaje específico para el mensajero del receptor CB<sub>1</sub>.





**Figura 12. Las neuronas dopaminérgicas de la SN no expresan el receptor CB<sub>1</sub>.** (B-F) Hibridación *in situ* doble para el receptor CB<sub>1</sub> (marcaje con <sup>35</sup>S, granos de plata) y TH (marcaje con digoxigenina, precipitado violeta negruzco). **A.** Esquema del atlas de Paxinos y Watson (2005) que muestra la localización anatómica de las microfotografías. **B.** Nótese la expresión de TH (precipitado) y la ausencia del receptor CB<sub>1</sub> (granos de plata) en neuronas de la SNc. **C y E** muestran un detalle de la SN tomado de B, con microscopía de campo oscuro (C) y de campo claro (E), donde no se observaron granos de plata en las neuronas TH-positivas. En **D y F** se muestra un detalle de hipocampo de la misma sección, que demuestra la presencia del receptor CB<sub>1</sub> (granos de plata) y la ausencia de TH en células del hipocampo, en campo oscuro (D) y claro (F). Barras: 25 µm en C-F y 400 µm en B.



### **1.3. Expresión del ARN mensajero del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> en neuronas de proyección estriatales.**

Para determinar si el receptor CB<sub>1</sub> en el estriado coexpresa con los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>, se realizaron estudios de **hibridación *in situ* dobles**, hibridando, simultáneamente, la ribosonda del receptor CB<sub>1</sub> con ribosondas específicas para cada uno de los marcadores de las neuronas de proyección: sustancia P (SP, marcador de neuronas estriatonigrales o de la vía directa que expresan receptores D<sub>1</sub>) y encefalina (Enk, marcador de neuronas estriatopalidales o de la vía indirecta que expresan receptores D<sub>2</sub>). Se emplearon ribosondas marcadas con <sup>35</sup>S-CTP para el receptor CB<sub>1</sub>, cuyo revelado originó un precipitado de granos de plata, y ribosondas marcadas con digoxigenina-UTP para los marcadores de las neuronas de proyección, observándose un precipitado de color violeta. La señal de hibridación obtenida para cada una de las ribosondas empleadas fue específica y reproducible. La especificidad de las ribosondas se determinó mediante una sonda sentido que no provocó ninguna señal, por lo que se utilizó como control negativo.

La ribosonda del receptor CB<sub>1</sub> originó agrupaciones de granos de plata en casi todas las neuronas del estriado (figs 13, 14 y 15). Cada una de estas neuronas presentó una señal de hibridación mayor que la señal de fondo autorradiográfica, indicando que la mayoría de las neuronas del estriado expresan el receptor CB<sub>1</sub>. Las neuronas de proyección estriatonigrales y estriatopalidales presentaron el mismo patrón de expresión del receptor CB<sub>1</sub>, observándose una coexpresión ligeramente mayor en la zona dorsolateral.

Estos resultados demuestran que el ARNm del receptor CB<sub>1</sub> se expresa en ambas poblaciones neuronales, existiendo coexpresión con los mensajeros de sustancia P/D<sub>1</sub> y encefalina/D<sub>2</sub>.

### **Cuantificación de la expresión del receptor CB<sub>1</sub> en neuronas de proyección.**

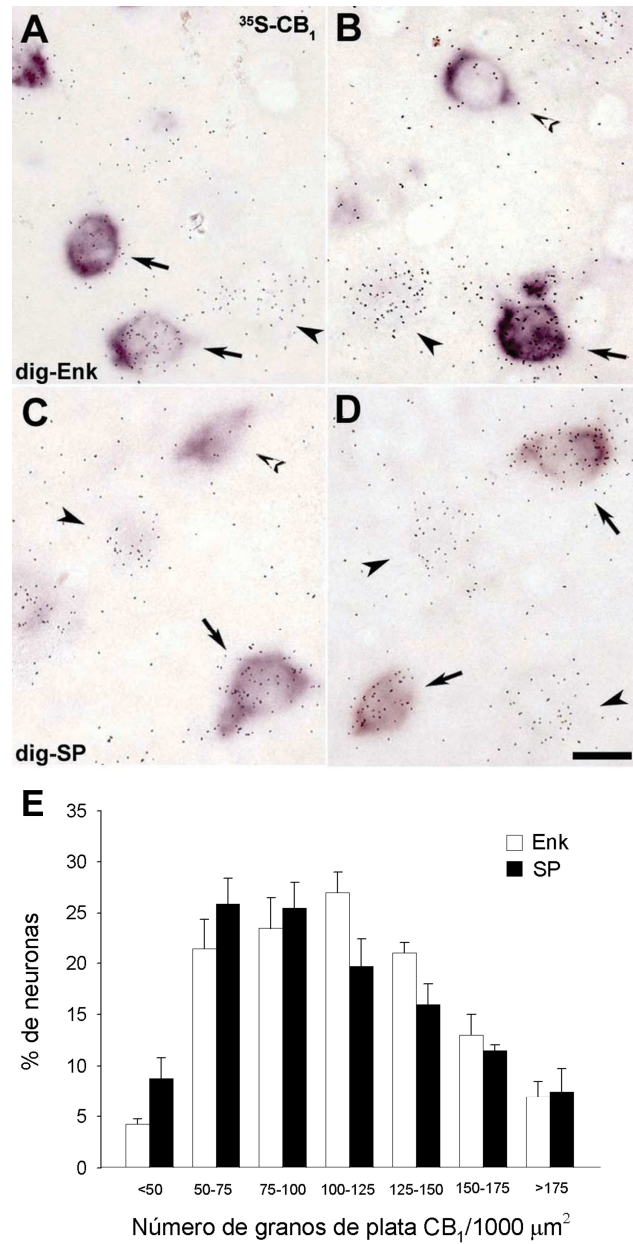
Con el objeto de estudiar si el receptor CB<sub>1</sub> se expresa con la misma intensidad en las dos poblaciones neuronales del estriado, se realizó la cuantificación de los granos de plata en neuronas estriatopalidales y estriatonigrales.

Este experimento se llevó a cabo con varias secciones de 3 cerebros procesados simultáneamente. Se cuantificaron las neuronas con marcaje sencillo y doble en el estriado dorsal (caudado-putamen completo excluyendo núcleo acumbens). Ambos

tipos de neuronas de proyección estriatal, presentaron un marcaje con una intensidad de señal similar (fig 13A-D) y una distribución de los granos de plata del receptor CB<sub>1</sub> en campana de Gauss (fig 13E).

En ambas poblaciones se observó un porcentaje muy bajo de células que contienen menos de 50 o más de 175 granos de plata/1000  $\mu\text{m}^2$ . El porcentaje de células Enk<sup>+</sup> (células encefalinérgicas que coexpresan con el receptor CB<sub>1</sub>) aumenta gradualmente en aquellas células que contienen de 50-125 granos de plata/1000  $\mu\text{m}^2$ , llegando a un porcentaje máximo de 26.8%. El porcentaje de neuronas Enk<sup>+</sup> que contienen de 125-175 o > 175 granos de plata/1000  $\mu\text{m}^2$  desciende gradualmente de forma inversamente proporcional al número de granos, de manera que cuanto mayor es el número de granos de plata por unidad de superficie celular menor es el porcentaje de células que los contienen. La población de neuronas SP<sup>+</sup> (células dinorfinérgicas que coexpresan con el receptor CB<sub>1</sub>) con 50-100 granos de plata/1000  $\mu\text{m}^2$  son las que representaron un mayor porcentaje, en concreto el 25.57%. El porcentaje de neuronas SP<sup>+</sup> que contienen de 100-175 o > 175 granos de plata/1000  $\mu\text{m}^2$  desciende gradualmente de forma inversamente proporcional al número de granos, igual que en las células Enk<sup>+</sup>.

No existen diferencias significativas entre las dos poblaciones neuronales, aunque hay mayor cantidad de células SP<sup>+</sup> que contienen menos de 100 granos de plata en 1000  $\mu\text{m}^2$ . En las células que contienen mayor número de granos de plata se invierte el resultado y son las células Enk<sup>+</sup> las que aumentan con respecto a las anteriores.

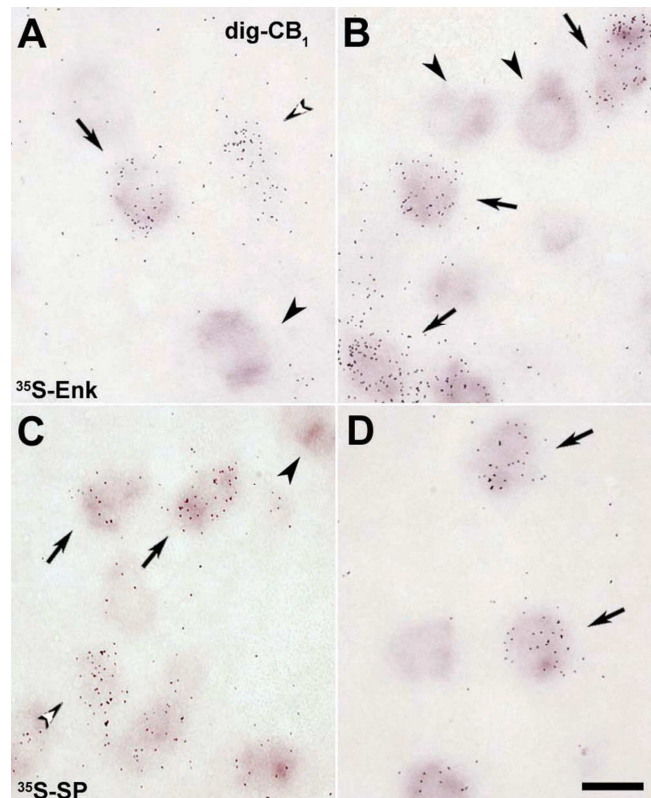


**Figura 13. Expresión del receptor  $\text{CB}_1$  en las neuronas estriatales de proyección.** Hibridación *in situ* doble con una sonda  $^{35}\text{S}$ -cRNA para el receptor  $\text{CB}_1$  humano (detectado con granos de plata) en combinación con sondas marcadas con digoxigenina para Enk y SP, marcadores de neuronas de proyección en estriado (detectadas por un precipitado violeta negruzco). Las flechas indican neuronas doblemente marcadas para el receptor  $\text{CB}_1$  y Enk (A y B) o para el receptor  $\text{CB}_1$  y SP (C y D). Los receptores  $\text{CB}_1$  se expresan en los dos tipos de neuronas, aunque no todas las neuronas expresan receptores  $\text{CB}_1$ . Las puntas de flecha negras indican  $\text{CB}_1^+/\text{Enk}^-$  en A y B;  $\text{CB}_1^+/\text{SP}^-$  en C y D. Las puntas de flecha blancas indican neuronas que expresan solamente Enk en B, o SP en C. Barra de calibración 10  $\mu\text{m}$ . **E.** Porcentaje de neuronas Enk+ y SP+ con diferentes grados de expresión del receptor  $\text{CB}_1$  cuantificados por el número de granos de plata presentes en cada célula. Nótese que la distribución de granos de plata es similar en ambas poblaciones neuronales; sin embargo, existe un porcentaje mayor de células SP+ con menor expresión y de células Enk+ con mayor expresión.

### Confirmación del fenotipo neuronal mediante la inversión de marcajes.

Para confirmar que los resultados anteriores no se debían a diferencias entre la distinta sensibilidad de los dos tipos de marcaje, se realizó una **hibridación *in situ* doble** invirtiendo los marcajes. Para ello, la ribosonda del receptor CB<sub>1</sub> se marcó con digoxigenina-UTP mientras que las ribosondas para las neuronas de proyección (encefalina y sustancia P) se sintetizaron incorporando <sup>35</sup>S-CTP.

Los resultados obtenidos confirman los anteriores; es decir, que existe coexpresión del ARN mensajero del receptor CB<sub>1</sub> con el receptor dopaminérgico D<sub>1</sub> en neuronas que expresan SP, y con el receptor dopaminérgico D<sub>2</sub> en neuronas que expresan Enk (Fig 14).



**Figura 14. Confirmación de la expresión de receptores CB<sub>1</sub> en neuronas estriales por marcaje reverso.** Doble hibridación *in situ* con la ribosonda del receptor CB<sub>1</sub> marcada con digoxigenina (detectada por un precipitado de color violeta negruzco) y las ribosondas de Enk y SP marcadas con <sup>35</sup>S (granos de plata). Las flechas indican neuronas doblemente marcadas para el receptor CB<sub>1</sub> y Enk (**A y B**), y para el receptor CB<sub>1</sub> y SP (**C y D**). Las puntas de flecha negras indican que no todas las neuronas que expresan el receptor CB<sub>1</sub> expresan Enk (**A y B**) o SP (**C**). Las puntas de flecha blancas muestran neuronas Enk<sup>+</sup> o SP<sup>+</sup> carentes de señal para el receptor CB<sub>1</sub>. Barra de calibración 10 μm.

### **Análisis cuantitativo de coexpresión del receptor CB<sub>1</sub> y neuronas Enk+ y SP+**

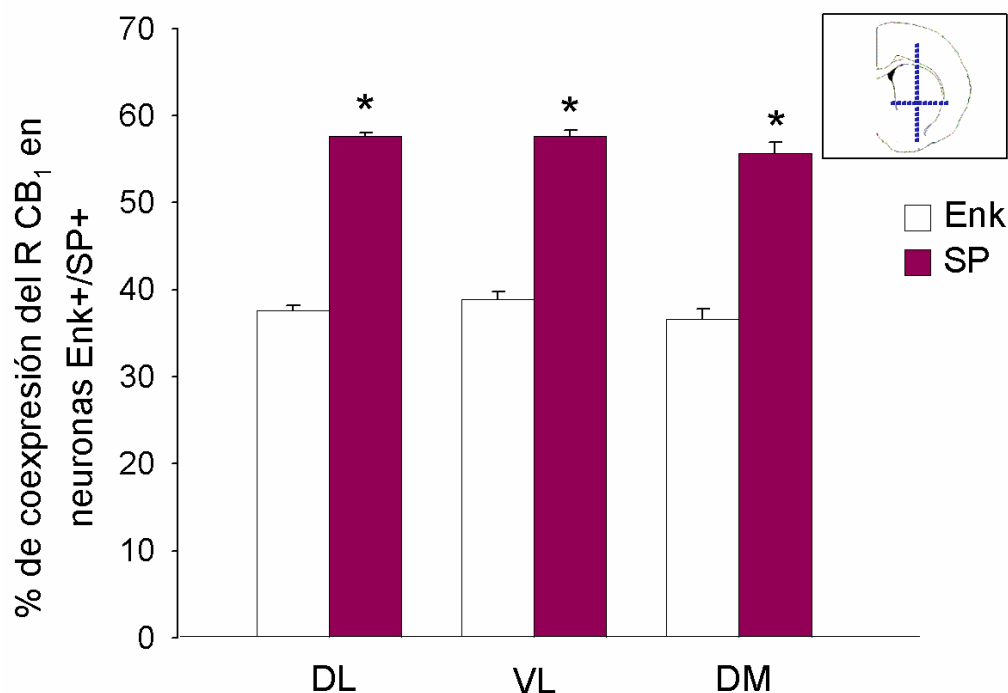
Los resultados obtenidos permitieron realizar un análisis cuantitativo de la coexpresión del ARNm del receptor CB<sub>1</sub> y del ARNm de las neuronas de proyección del estriado. Se evaluó el porcentaje de células CB<sub>1</sub> que expresan sustancia P y las que expresan encefalina. La cuantificación se realizó al microscopio óptico, dividiendo el estriado en tres zonas: área dorsolateral (DL), área ventrolateral (VL) y área dorsomedial (DM) (fig 15). El análisis de los resultados indicó que:

- El porcentaje de células que coexpresan el receptor CB<sub>1</sub> y SP fue de un  $55.7\% \pm 0.36$  (DL), un  $57.6\% \pm 0.7$  (VL) y un  $55.7\% \pm 1.22$  (DM).
- El porcentaje de células que coexpresan el receptor CB<sub>1</sub> y Enk fue de un  $37.6\% \pm 0.59$  (DL), un  $38.9\% \pm 0.83$  (VL) y un  $36.7 \pm 1.19$  (DM).

Los resultados demostraron que del número total de neuronas estriatales que expresan el receptor CB<sub>1</sub>, aproximadamente un 36-39 % son neuronas Enk+ y un 55-58 % neuronas SP+. Los porcentajes de coexpresión fueron semejantes en todas las áreas estriatales estudiadas, DL, VL y DM, independientemente del gradiente de expresión de receptores CB<sub>1</sub> que existe en el estriado ( $p < 0.001$  Test t-student).

Estos datos permitieron establecer que existe una mayor coexpresión de los receptores CB<sub>1</sub> con receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> (CB<sub>1</sub>/SP) que con receptores D<sub>2</sub> (CB<sub>1</sub>/Enk).

Además, este patrón de colocación sugiere que tanto las neuronas de proyección de la vía directa como las de la vía indirecta, son el sustrato neuroanatómico para la modulación cannabinoide sobre las funciones de los ganglios basales.



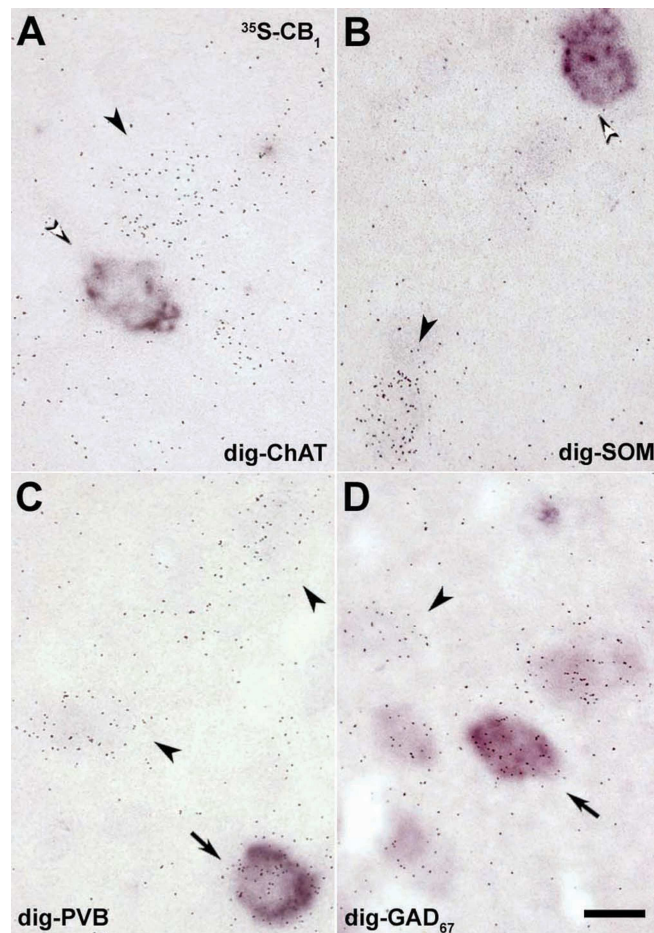
**Figura 15. Cuantificación de las neuronas de proyección que expresan el receptor CB<sub>1</sub>.** Los histogramas muestran el porcentaje de neuronas CB<sub>1</sub><sup>+</sup> que expresan Enk (marcador de neuronas estriatopalidales) o SP (marcador de neuronas estriatonigrales) en diferentes regiones estriatales, dorsolateral (DL), dorsomedial (DM) y ventrolateral (VL). Aproximadamente un 40% de neuronas que expresan el receptor CB<sub>1</sub> son neuronas de proyección de la vía indirecta (Enk), mientras que un 60% son neuronas de proyección de la vía directa (SP). \*  $p < 0.05$  comparado con neuronas Enk<sup>+</sup>.

#### 1.4. Expresión del ARN mensajero del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> en interneuronas.

Para determinar si el receptor CB<sub>1</sub> se sintetiza también en las interneuronas del estriado, se llevó a cabo un estudio de **hibridación *in situ* doble** en el que las ribosondas específicas de las interneuronas que expresan parvalbúmina (PVB), somatostatina (SOM), colina acetiltransferasa (ChAT) y GAD-67 se marcaron con digoxigenina-UTP y se hibridaron simultáneamente con la ribosonda del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> (marcada con <sup>35</sup>S-CTP) en secciones estriatales.

Las interneuronas estriatales constituyen alrededor del 5% del total de las neuronas y se distribuyen en patrones anatómicos distintos por todo el estriado. Los resultados indican que existe coexpresión del receptor CB<sub>1</sub> con interneuronas que expresan parvalbúmina y GAD-67, con una intensidad de expresión semejante a la observada en las neuronas de proyección (Fig 16). La mayoría de estos dos tipos de

interneuronas expresan el receptor CB<sub>1</sub>, independientemente de su localización en el estriado. Se observó un gradiente lateromedial para las neuronas que expresan el receptor CB<sub>1</sub> y PVB, con mayor cantidad de células doblemente marcadas en el estriado lateral. No encontramos coexpresión del CB<sub>1</sub> con interneuronas somatostatina o ChAT.



**Figura 16. Expresión del receptor CB<sub>1</sub> en interneuronas estriatales.** Hibridación *in situ* doble con la ribosonda del receptor CB<sub>1</sub> marcada con <sup>35</sup>S (granos de plata) y las ribosondas de las interneuronas marcadas con digoxigenina (precipitado negro): **A:** Acetilcolina transferasa (ChAT); **B:** somatostatina (SOM); **C:** parvalbúmina (PVB); o **D:** Descarboxilasa del ácido glutámico 67 kD (GAD<sub>67</sub>). Las interneuronas PVB y GAD<sub>67</sub> expresan el receptor CB<sub>1</sub> mientras que las acetilcolina y somatostatina no lo expresan. Las flechas señalan interneuronas que expresan receptores CB<sub>1</sub> y PVB (**C**) o receptores CB<sub>1</sub> y GAD<sub>67</sub> (**D**). Las puntas de flecha negras indican interneuronas positivas solamente para receptores CB<sub>1</sub>. Las puntas de flecha blancas indican interneuronas negativas para receptores CB<sub>1</sub> y positivas para ChAT (**A**) o SOM (**B**). Barra de calibración 10 µm.

## 2. MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR CB<sub>1</sub> POR EL SISTEMA DOPAMINÉRGICO EN RATONES D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> Y D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>.

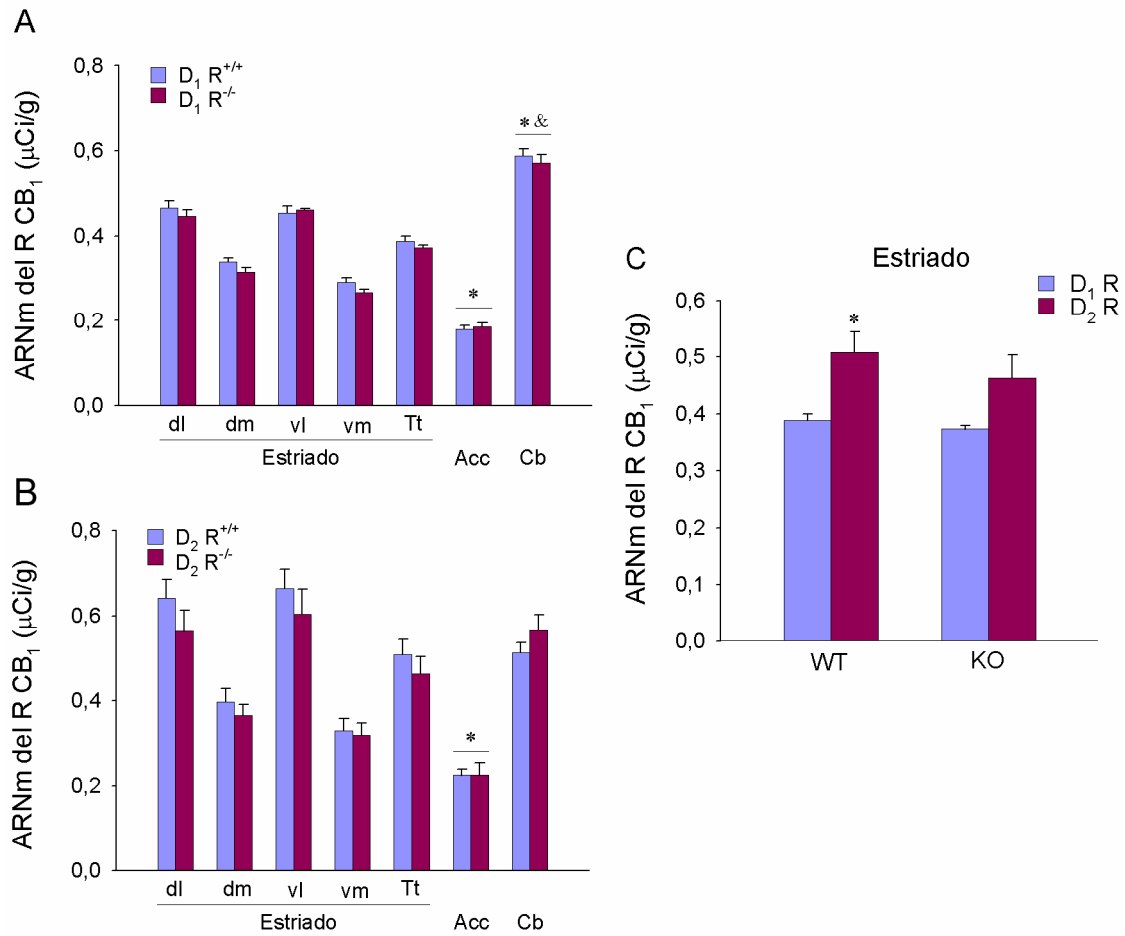
Se realizaron estudios de **hibridación *in situ*** para determinar la expresión del ARNm del receptor CB<sub>1</sub>, en ratones D<sub>1</sub>R<sup>+/+</sup> y D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> y ratones D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup> y D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>, en distintas estructuras cerebrales. Resultados anteriores demuestran que hay coexpresión del receptor CB<sub>1</sub> y los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>; por tanto, los experimentos descritos a continuación se realizaron con el fin de establecer si existe una modulación de la expresión del receptor CB<sub>1</sub> por el sistema dopaminérgico, a través sus dos receptores más representativos.

Los estudios llevados a cabo demostraron que el patrón anatómico de expresión del ARN mensajero del receptor CB<sub>1</sub> en ratón es muy semejante al descrito en rata. En el estriado se localiza una gran parte de transcritos del receptor CB<sub>1</sub>, en corteza e hipocampo se observaron células dispersas con concentraciones abundantes del receptor, y en el núcleo accumbens la expresión del receptor CB<sub>1</sub> fue menor que en el resto de las estructuras antes citadas. Además, se realizó el estudio de expresión del receptor en cerebelo, observándose un número elevado de transcritos.

La cuantificación del ARNm del receptor CB<sub>1</sub> se realizó con el método de análisis de imagen, Scion image, en tres núcleos cerebrales: estriado, núcleo accumbens y cerebelo. No se observaron diferencias significativas en la expresión del receptor CB<sub>1</sub> entre los ratones WT y sus correspondientes KO (Fig 17). En cambio, se observaron diferencias cuando la comparación fue entre colonias de ratón. En la colonia de ratones D<sub>1</sub>, la mayor expresión de CB<sub>1</sub> se encontró en cerebelo, seguido de estriado y de núcleo accumbens (Fig 17A). En la colonia de ratones de D<sub>2</sub>, el número de transcritos fue mayor en estriado y cerebelo que en el núcleo accumbens (Fig 17B). Además, en el estriado, la expresión del receptor CB<sub>1</sub> fue mayor en la colonia de ratones de D<sub>2</sub>, aunque no llegó a ser significativo entre los ratones KO (D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> y D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>, Fig 17C).

Estos resultados indican que la expresión del receptor CB<sub>1</sub> es independiente de la expresión de los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> ya que la delección o inactivación de dichos receptores no modifica la expresión del receptor CB<sub>1</sub>.





**Figura 17. La expresión del receptor CB<sub>1</sub> es independiente de los receptores dopaminérgicos.** Los histogramas muestran la expresión del mensajero del CB<sub>1</sub> en diferentes núcleos cerebrales: Estriado, dorsolateral (dl), dorsomedial (dm), ventrolateral (vl), ventromedial (vm) y total (Tt); núcleo accumbens (Acc) y cerebelo (Cb), en la colonia de ratones D<sub>1</sub> (A) o en la de D<sub>2</sub> (B). No se observaron diferencias significativas entre los genotipos de la misma colonia, pero sí entre las colonias de ratones D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> (C). A. \* p<0.001 vs estriado y & p<0.001 vs Acc. B. \* p<0.001 vs estriado y cerebelo. C. \* p<0.01 vs D<sub>1</sub>R<sup>+/+</sup>. (Test de Student, n=6).

### **3. PAPEL FUNCIONAL DEL SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO EN RESPUESTAS CONDUCTUALES MEDIADAS POR LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS D<sub>1</sub> Y D<sub>2</sub>.**

Para determinar el papel funcional del sistema cannabinoide endógeno, se realizaron distintos estudios comportamentales en los que se evaluaron conducta rotacional, grooming y estereotipias orales.

#### **3.1. AM 404, bloqueante de la recaptación de anandamida, reduce la respuesta mediada por los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> en grooming y movimientos orales.**

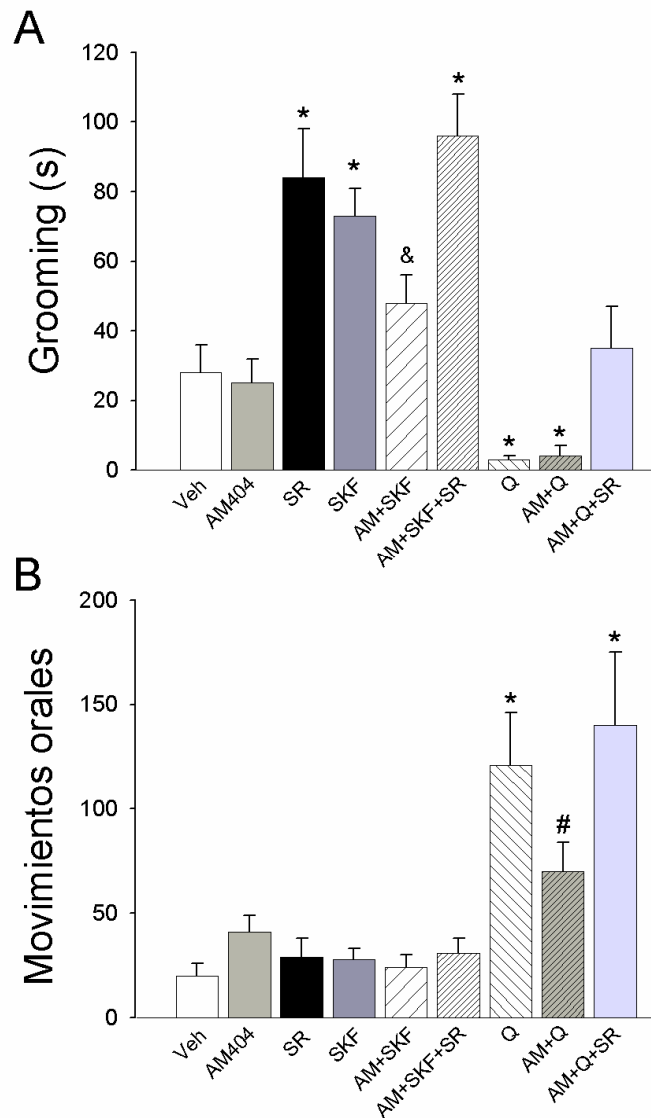
Para investigar la importancia funcional de la colocalización anatómica en el estriado, de los receptores de dopamina D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> con los receptores CB<sub>1</sub>, estudiamos el efecto del incremento del tono cannabinoide sobre comportamientos mediados por los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>.

Estudios anteriores han demostrado que el SKF 38393, agonista del receptor D<sub>1</sub>, aumenta el grooming, mientras que el tratamiento con quinpirol, agonista preferentemente D<sub>2</sub>, disminuye notablemente dicha respuesta (Molloy y Waddington, 1987). En nuestro estudio se utilizó AM 404, bloqueante de la recaptación de anandamida, que aumentó los niveles extracelulares de cannabinoides endógenos. Se ha demostrado que el AM 404 incrementa los niveles de los dos cannabinoides endógenos más importantes: anandamida (Beltramo y cols., 1997 y 2000), y 2-araquidonil glicerol (2-AG) (Bisogno y cols., 2001).

En los experimentos realizados, el tratamiento con AM 404 dio lugar a una reducción significativa del grooming inducido por SKF 38393, pero no se observó ningún efecto sobre la reducción del grooming inducida por quinpirol (Fig 18A). Estos resultados indican que los niveles de anandamida aumentaron, modificando el comportamiento de grooming, después de la estimulación del receptor D<sub>1</sub>, pero no después del estímulo del receptor D<sub>2</sub>, sugiriendo así que los receptores CB<sub>1</sub> podrían tener un papel inhibitorio en esta secuencia del complejo motor mediada por los receptores D<sub>1</sub>.

El antagonista del receptor CB<sub>1</sub>, SR 141716A, invirtió el efecto inhibitorio del AM 404 aumentando el comportamiento de grooming. El SR 141716A también invirtió los efectos del quinpirol, antagonizando la inhibición del receptor CB<sub>1</sub> sobre las acciones mediadas por el receptor D<sub>1</sub> (Fig 18A). Además, el agonista del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>, HU-210, suprimió el grooming inducido por SKF 38393 (Tabla II), confirmando

de nuevo el papel inhibitorio del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> sobre el grooming inducido por el receptor dopaminérgico D<sub>1</sub>.



**Figura 18. AM 404 disminuye la respuesta mediada por los receptores de dopamina D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>.** **A.** Duración del comportamiento de grooming después de la administración del agonista del receptor D<sub>1</sub>, SKF 38393 (SKF, 5 mg/kg) o del agonista del receptor D<sub>2</sub>, quinpirol (Q, 1 mg/kg), con o sin pretratamiento con AM 404 (AM, 10 mg/kg) o el antagonista del CB<sub>1</sub>, SR 141716A (1 mg/kg). **B.** Movimientos orales tras quinpirol (1 mg/kg) o SKF 38393 (5 mg/kg), con o sin pretratamiento con AM 404 (10 mg/kg) o SR 141716A (1 mg/kg). \* p < 0.01 vs veh; & p < 0.05 vs SKF; # p < 0.05 vs quinpirol y veh, n=8, (test de Newman-Keuls).

Se realizaron estudios comportamentales para evaluar los movimientos orales en ratas, que aumentaron considerablemente después del tratamiento con quinpirol (Fig 18B;  $p < 0.05$ ).

La administración de AM 404 y SKF 81297, individual o conjunta, no presentó ningún efecto sobre el nivel basal de movimientos orales, indicando así que dicho comportamiento está regulado por la activación de los receptores  $D_2$  (Fig 18B).

El AM 404 administrado 15 minutos antes del quinpirol redujo considerablemente los movimientos orales provocados por quinpirol. El efecto inhibitorio de AM 404 fue revertido por el SR 141716A (Fig 18B) y por HU-210 (Tabla II).

Los resultados ponen de manifiesto que los receptores  $CB_1$  tienen un efecto inhibitorio sobre el comportamiento oral mediado por los receptores  $D_2$  en la rata.

**Tabla II. El agonista del receptor cannabinoide  $CB_1$ , HU-210, bloquea los comportamientos mediados por ambos tipos de receptores dopaminérgicos  $D_1$  y  $D_2$  a través de la activación del receptor  $CB_1$ .**

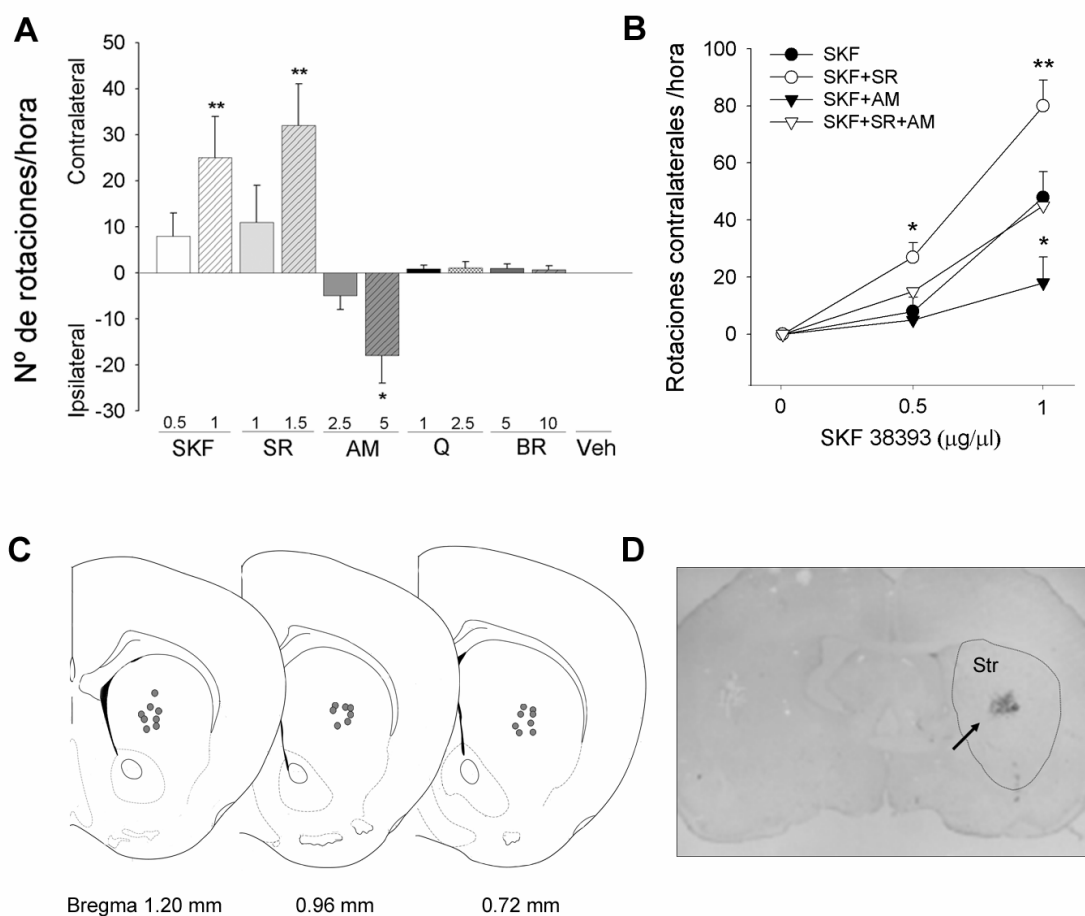
	Tiempo empleado en grooming (s)	Movimientos orales
Vehículo	$28 \pm 8$	$19 \pm 5$
HU-210 (HU), 20 $\mu$ g/kg	$5 \pm 4$ *	$3 \pm 3$ *
SR 141716A (SR), 1 mg/kg	$84 \pm 14$ *	$29 \pm 9$
SKF 38393 (SKF), 5 mg/kg	$73 \pm 10$ *	$28 \pm 5$
HU+SKF	$18 \pm 9$ &	$9 \pm 3$ *
HU+SKF+SR	$36 \pm 10$	$21 \pm 4$
Quinpirol (Q), 1 mg/kg	$3 \pm 1$ *	$121 \pm 25$ *
HU+Q	$0 \pm 0$ *	$30 \pm 12$
HU+Q+SR	$20 \pm 12$	$76 \pm 10$ #

Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM de, al menos, 8 animales por grupo. \*  $p < 0.05$  vs vehículo; #  $p < 0.05$  vs quinpirol y vehículo; &  $p < 0.05$  vs SKF

### 3.2. Efecto opuesto de ligandos cannabinoides y dopaminérgicos sobre el comportamiento rotacional

La infusión intraestriatal de SKF 38393 (agonista del receptor  $D_1$ ) o del SR 141716A (antagonista específico del receptor  $CB_1$ ) aumentó de manera dosis dependiente el número de rotaciones contralaterales, SKF 38393 ( $F_{2, 29} = 45$ ,  $p < 0.01$ ) y SR 141716A ( $F_{2, 29} = 88$ ,  $p < 0.01$ , Fig. 19A). Por el contrario, la infusión intraestriatal del compuesto AM 404 incrementó de forma dosis dependiente el número de rotaciones ipsilaterales, AM 404 ( $F_{2, 29} = 65$ ,  $p < 0.01$ ), mientras que quinpirol (1 o 2.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) o bromocriptina (5 y 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) no mostraron ningún efecto en el comportamiento rotacional. Estos datos indican que la función motora, en el estriado inyectado, aumentó después de la administración del agonista  $D_1$  o del antagonista del receptor  $CB_1$ , mientras que el agonista indirecto del  $CB_1$ , AM 404, causó una depresión motora indicada por la dirección (ipsilateral) y el número de rotaciones. La activación de los receptores dopaminérgicos  $D_2$  con quinpirol o bromocriptina no afectó al comportamiento rotacional (Fig 19A).

Para investigar si el sistema cannabinoide puede modificar el comportamiento rotacional inducido por agonistas dopaminérgicos, aumentamos o disminuimos la actividad de receptor  $CB_1$  y estudiamos el efecto inducido por la inyección intraestriatal de SKF 38393 sobre la rotación (no usamos quinpirol o bromocriptina ya que dichos compuestos no presentaron efectos independientes sobre la rotación). En los estudios estadísticos se evaluaron los datos mediante un análisis de varianza de dos factores, que reveló una interacción significativa entre SKF 38393 y los ligandos cannabinoides ( $F_{6, 72} = 34.3$ ,  $p < 0.01$ ). El pretratamiento con SR 141716A (1.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), 5 minutos antes de la inyección intraestriatal de SKF 38393, originó una potenciación de las rotaciones contralaterales inducidas por el SKF 38393. Esta potenciación se observó a una dosis de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de SKF 38393 ( $p < 0.01$  vs SR 141716A o SKF 38393 sólo; Fig 19B). Por el contrario, el pretratamiento con AM 404 (5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) disminuyó significativamente las rotaciones contralaterales inducidas por una dosis de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de SKF 38393 ( $p < 0.05$  vs AM 404 o SKF 38393 sólo; Fig 19B). Este efecto se bloqueó con SR 141716A (1.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) antes de la inyección de AM 404 (Fig 19B).



**Figura 19. Efecto de ligandos del receptor CB<sub>1</sub> sobre las rotaciones inducidas por la administración intraestriatal de agonistas de los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>.** **A.** Rotaciones (contralaterales o ipsilaterales por hora) inducidas por la administración intraestriatal de SKF 38393 (SKF), SR 141716A (SR), AM 404 (AM), quinpirol (Q) o bromocriptina (BR). **B.** Rotaciones contralaterales inducidas por la co-administración de agonistas dopaminérgicos y agentes cannabinoides. Datos expresados como valores medios  $\pm$  EEM, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs vehículo en A o vs SKF 38393 en B,  $n=8-10$ , Test de Student. Las dosis empleadas se expresan en  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . **C.** Representación de los lugares de infusión en el estriado izquierdo sobre secciones esquemáticas del atlas de rata, Paxinos y Watson (2005). Se indica también la distancia a Bregma. **D.** Foto representativa del sitio de inyección en una sección coronal de cerebro de rata teñida con la técnica de Nissl (los contornos del estriado se dibujaron con una línea fina). Se rechazaron todos los datos de animales en los cuales los experimentos histológicos revelaron que la cánula no se encontraba en el estriado. Abrev.: Str, Estriado.

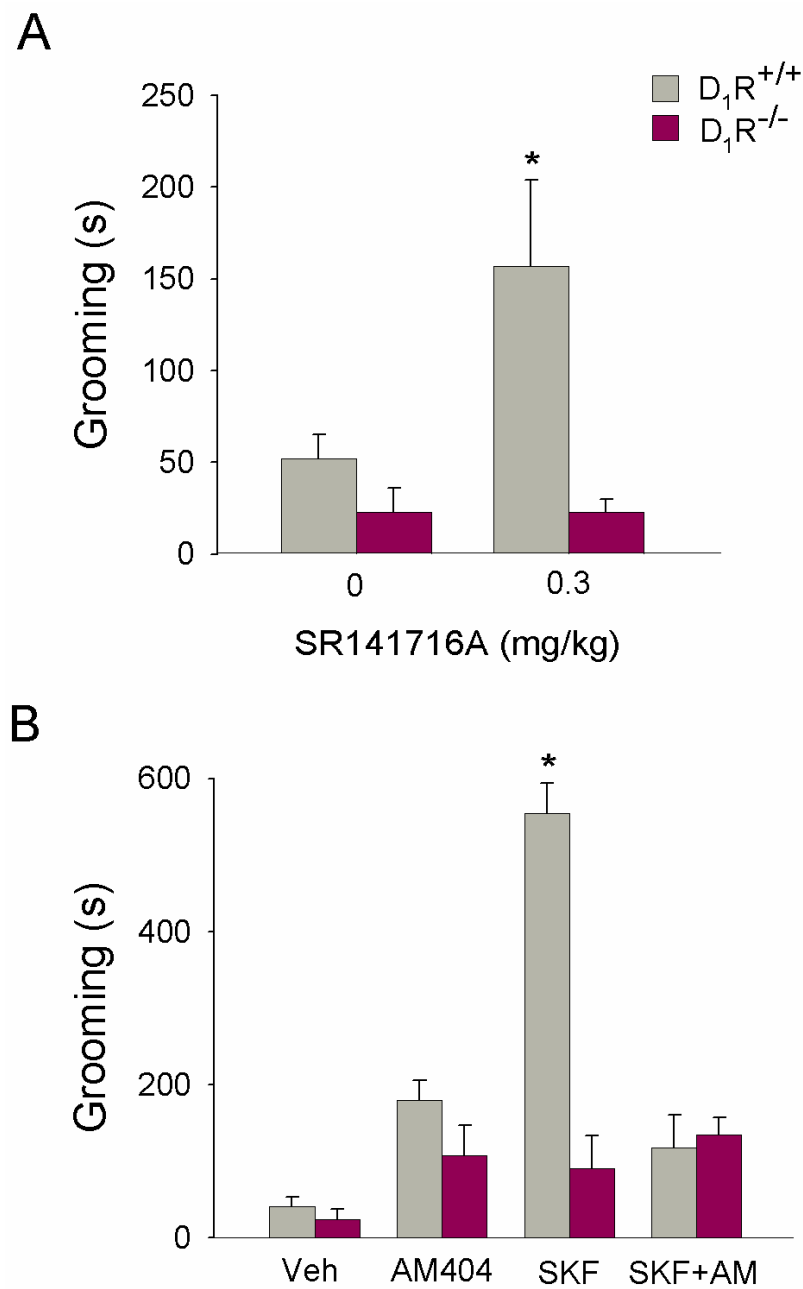
Por tanto, se observó un aumento de la función del receptor D<sub>1</sub> por el bloqueo de los receptores CB<sub>1</sub> y una reducción de la función cuando se administró una concentración creciente del agonista endógeno CB<sub>1</sub>, AM 404. El efecto producido por éste parece ser mediado por receptores CB<sub>1</sub>, ya que se bloquea por el antagonista SR 141716A.

Para todos los experimentos realizados que implicaron una inyección intraestriatal se confirmó el sitio de inyección histológicamente, y sólo se analizaron aquellos animales en que el sitio de inyección fue correcto. La figura 19C ilustra la posición de la cánula central en el estriado izquierdo y la 19D muestra una sección coronal representativa teñida con la técnica de Nissl. El estudio de los tejidos cerebrales reveló una pequeña lesión y gliosis en el sitio de inyección, aunque generalmente el tejido circundante permaneció intacto.

### **3.3. Interacción funcional entre los receptores CB<sub>1</sub> y D<sub>1</sub>: Estudios en ratones D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>**

Con el fin de obtener datos adicionales para demostrar la interacción inhibitoria entre los receptores D<sub>1</sub> y CB<sub>1</sub>, evaluamos el comportamiento de grooming en ratones carentes del receptor D<sub>1</sub> (D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>). El bloqueo de los receptores CB<sub>1</sub> con SR 141716A aumentó la duración del grooming en ratones D<sub>1</sub>R<sup>+/+</sup> (p <0.01), pero no en los ratones D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> (Fig 20A). Estos resultados indican que el efecto del SR 141716A sobre el comportamiento de grooming es mediado por los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub>, probablemente debido a la liberación de endocannabinoides inhibitorios que modulan los comportamientos mediados por el receptor D<sub>1</sub>.

El agonista dopaminérgico D<sub>1</sub>, SKF 81297, aumentó el grooming en ratones D<sub>1</sub>R<sup>+/+</sup> (p <0.01) pero no se observó efecto en ratones D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>, lo que confirmó la selectividad del SKF 81297 por el receptor D<sub>1</sub> y que este comportamiento está mediado por D<sub>1</sub>. El compuesto AM 404 no presentó ningún efecto significativo sobre el grooming en ratones D<sub>1</sub>R<sup>+/+</sup> ni D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> (Fig 20B). Confirmando los datos mostrados en la figura 18, AM 404 disminuyó el efecto de SKF 81297 en ratones D<sub>1</sub>R<sup>+/+</sup>. En ratones D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>, no se observó ningún efecto de dichas drogas, ni por separado ni combinadas (Fig 20).



**Figura 20. El grooming inducido por el antagonista SR 141716A está mediado por el receptor  $D_1$ .** **A.** La administración de SR 141716A (SR, 0.3 mg/kg), aumentó el comportamiento de grooming en ratones  $D_1R^{+/+}$ , pero no en ratones  $D_1R^{-/-}$ . **B.** La administración del agonista dopaminérgico  $D_1$ , SKF 81297 (5 mg/kg), aumentó el grooming en ratones  $D_1R^{+/+}$  y esta respuesta se redujo con la co-administración de AM 404. No se observó ningún efecto con la administración de las distintas drogas en ratones  $D_1R^{-/-}$ . \*  $p < 0.01$ ,  $n=8$ , Test de Newman-Keuls.



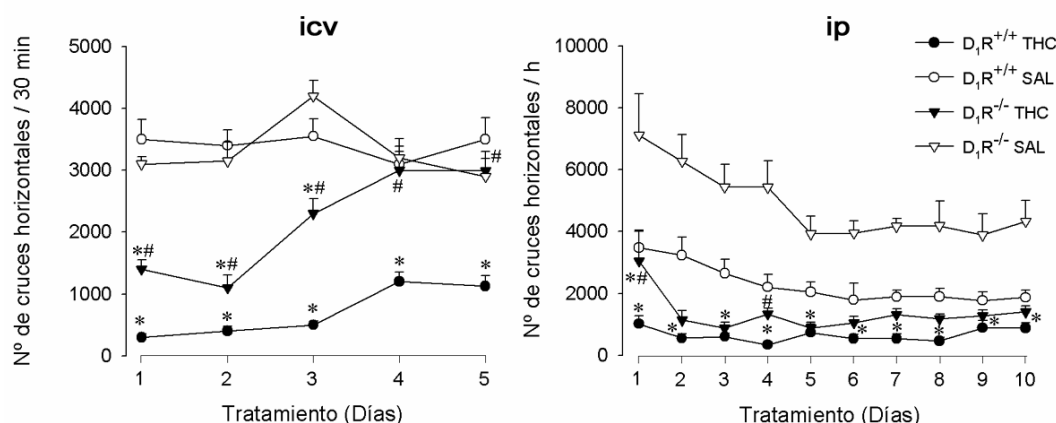
#### 4. PAPEL DE LOS RECEPTORES D<sub>1</sub> Y D<sub>2</sub> EN LAS ACCIONES MEDIADAS POR LOS CANNABINOIDES.

Para determinar si el sistema dopaminérgico modula otras acciones de los cannabinoides estudiamos la **actividad motora**, la **variación de temperatura** y el **efecto analgésico** inducidos tras la administración intracerebroventricular (icv) o intraperitoneal (ip) de THC en ratones WT y KO de los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>. Además se realizaron **estudios de condicionamiento espacial y síndrome de abstinencia** en ratones D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup> y D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>.

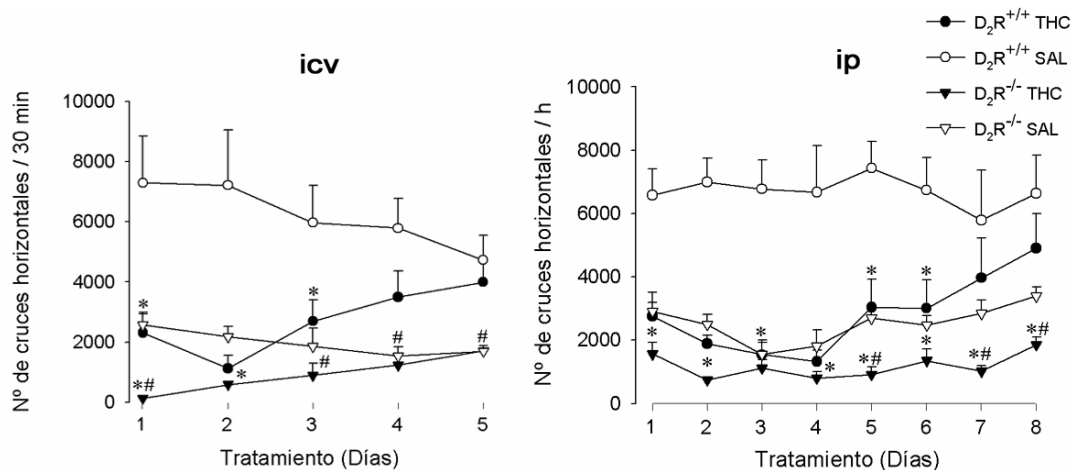
##### 4.1. Impacto de la inactivación de los receptores dopaminérgicos en la respuesta motora inducida por THC.

La administración de THC (icv e ip) disminuyó la actividad locomotora en los ratones salvajes observándose una disminución menor en los ratones D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>. La administración crónica local de THC (10 µg dos veces al día, icv) desarrolló tolerancia en ambos grupos de ratones, aunque la inactivación del receptor D<sub>1</sub> intensificó dicha tolerancia y ésta se desarrolló antes. Sin embargo, con la administración ip (10 mg/kg diarios) sólo desarrollaron tolerancia los ratones D<sub>1</sub>R<sup>+/+</sup> en los días finales del tratamiento. No se observó tolerancia en los ratones D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> (Fig 21).

En los ratones D<sub>2</sub>, la administración de THC disminuyó la actividad locomotora en ambos genotipos siendo menor dicha disminución en los D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>. La administración crónica icv desarrolló tolerancia en los dos grupos de ratones. En la administración crónica ip la disminución de la actividad locomotora se mantuvo durante todo el tratamiento en ratones D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>, por lo que no se desarrolló tolerancia. En los ratones D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup> la actividad locomotora aumentó progresivamente a partir del día 5 del tratamiento observándose diferencias significativas con los ratones D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> tratados y desarrollando tolerancia (Fig 22). Los resultados obtenidos demuestran que el receptor dopaminérgico D<sub>2</sub> está implicado en la respuesta motora del THC y en el desarrollo de tolerancia inducida por el tratamiento crónico.



**Figura 21. La inactivación del receptor  $D_1$  disminuyó la depresión motora inducida por THC icv.** El THC se administró icv (10  $\mu$ g, 2 veces al día, durante 5 días) o ip (10 mg/kg durante 10 días). El THC disminuyó la actividad locomotora en ambos genotipos. El día 1 representa los efectos agudos de THC. La administración icv indujo un descenso menor en la actividad de los  $D_1R^{-/-}$  (#  $p < 0.05$  vs  $D_1R^{+/+}$  THC) y se desarrolló tolerancia en ambos genotipos, intensificándose en los ratones  $D_1R^{-/-}$ . Con el tratamiento crónico ip, la disminución de la actividad locomotora permaneció constante. Solamente desarrollaron tolerancia los ratones  $D_1R^{+/+}$  al final tratamiento. Diferencias significativas: \*  $p < 0.05$  vs  $D_1R^{+/+}$  y  $D_1R^{-/-}$  tratados con SAL, y #  $p < 0.05$  vs  $D_1R^{+/+}$  tratados con THC, según ANOVA de dos factores con medidas repetidas seguida por un test de Tukey *post-hoc*,  $n=5-7$ .

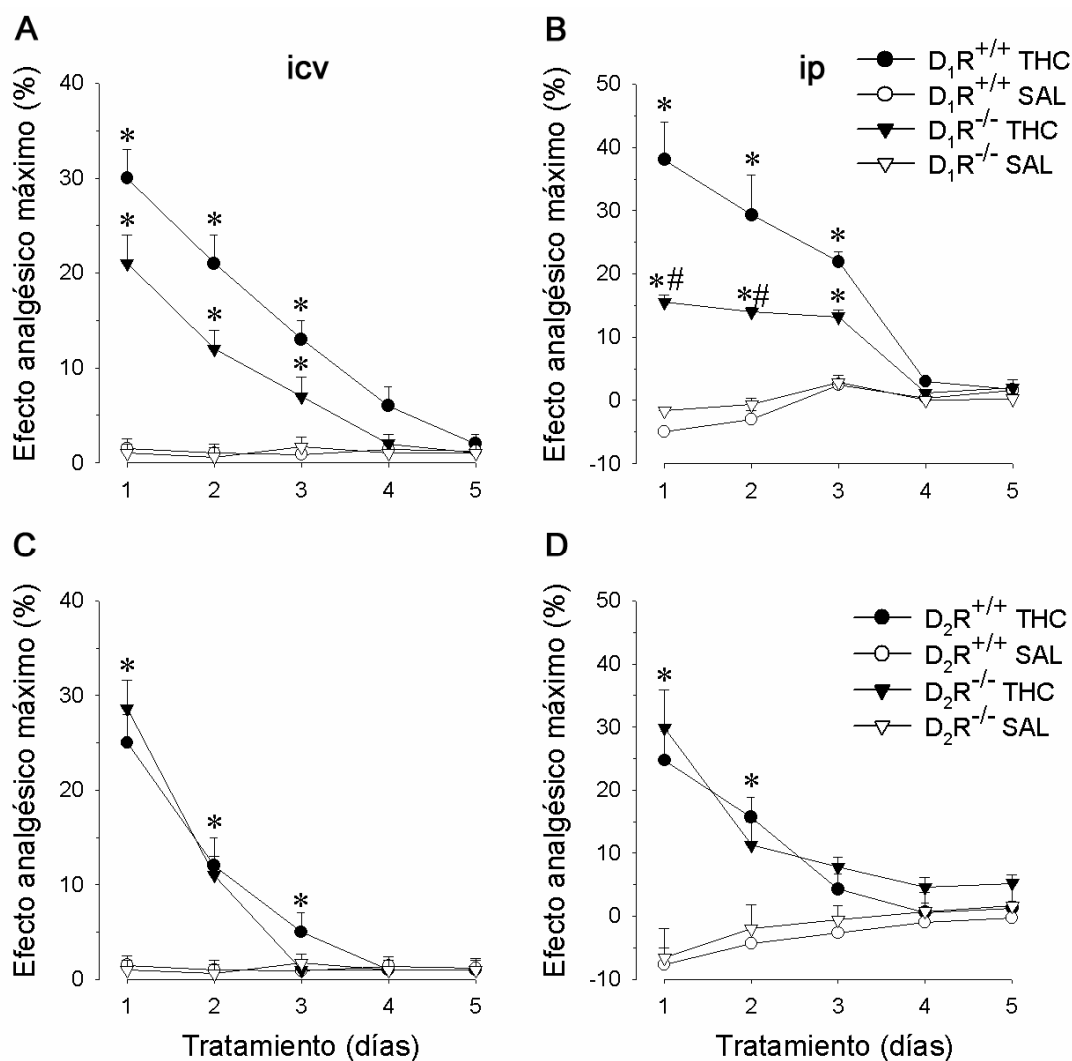


**Figura 22. El receptor dopaminérgico  $D_2$  está implicado en la respuesta motora y desarrollo de tolerancia inducido por THC.** El THC se administró icv (10  $\mu$ g, 2 veces al día, durante 5 días) o ip (10 mg/kg durante 8 días). La inactivación del  $D_2$  potenció, en parte, la disminución locomotora inducida por el THC por ambas vías de administración. El tratamiento crónico con THC desarrolló tolerancia a partir del día 4 (icv) o del día 5 (ip) en ratones  $D_2R^{+/+}$ . La inactivación de  $D_2$  inhibió el desarrollo de tolerancia en la administración ip. Diferencias significativas: \*  $p < 0.05$  vs  $D_2R^{+/+}$  y  $D_2R^{-/-}$  tratados con SAL y #  $p < 0.05$  vs  $D_2R^{+/+}$  tratados con THC, según ANOVA de dos factores con medidas repetidas seguida por un test de Tukey *post-hoc*,  $n=5-7$ .

#### **4.2. Impacto de la inactivación de los receptores dopaminérgicos sobre el efecto analgésico inducido por THC.**

Se llevaron a cabo estudios sobre el **efecto analgésico** inducido por THC en ratones D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>. Como en experimentos anteriores, se administraron 10 µg de THC dos veces al día (icv) y 10 mg/kg diarios (ip) durante 5 días consecutivos. En ambos grupos experimentales se observó un efecto analgésico semejante y desarrollo de tolerancia.

En los ratones D<sub>1</sub>, el efecto analgésico fue mayor en los D<sub>1</sub>R<sup>+/+</sup> que en los D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>, tanto en el tratamiento agudo (icv e ip), donde se alcanzó un efecto máximo, como en el crónico (icv e ip). En los dos grupos experimentales, la analgesia disminuyó con el tratamiento crónico, hasta igualarse con los ratones tratados con salino, desarrollando así tolerancia a partir del día 4 del tratamiento (Fig 23A, B). Entre los ratones D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup> y D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> tratados con THC no se observaron diferencias significativas en el efecto analgésico. El mayor efecto se alcanzó con el tratamiento agudo (icv e ip), disminuyendo el efecto significativamente ya en el día 2 del tratamiento crónico y desarrollando tolerancia a partir del día 3 del tratamiento (Fig 23C, D) en ambos genotipos.



**Figura 23. Implicación de los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> en el efecto analgésico inducido por THC.** El THC icv (10 µg en dos dosis diarias en un volumen de 4 µl) ip (10 mg/kg) indujo un efecto analgésico en ratones D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>, alcanzando el máximo con el tratamiento agudo. La inactivación del receptor D<sub>1</sub> disminuye el efecto analgésico del THC, aunque no afecta al desarrollo de tolerancia. La inactivación de D<sub>2</sub> no modificó ni la analgesia ni la tolerancia inducida por THC. Diferencias significativas: \* p<0.05 vs SAL y # p< 0.05 vs D<sub>1</sub>R<sup>+/+</sup>, según ANOVA de dos factores con medidas repetidas seguida por un test de Tukey *post-hoc*, n=6-10.

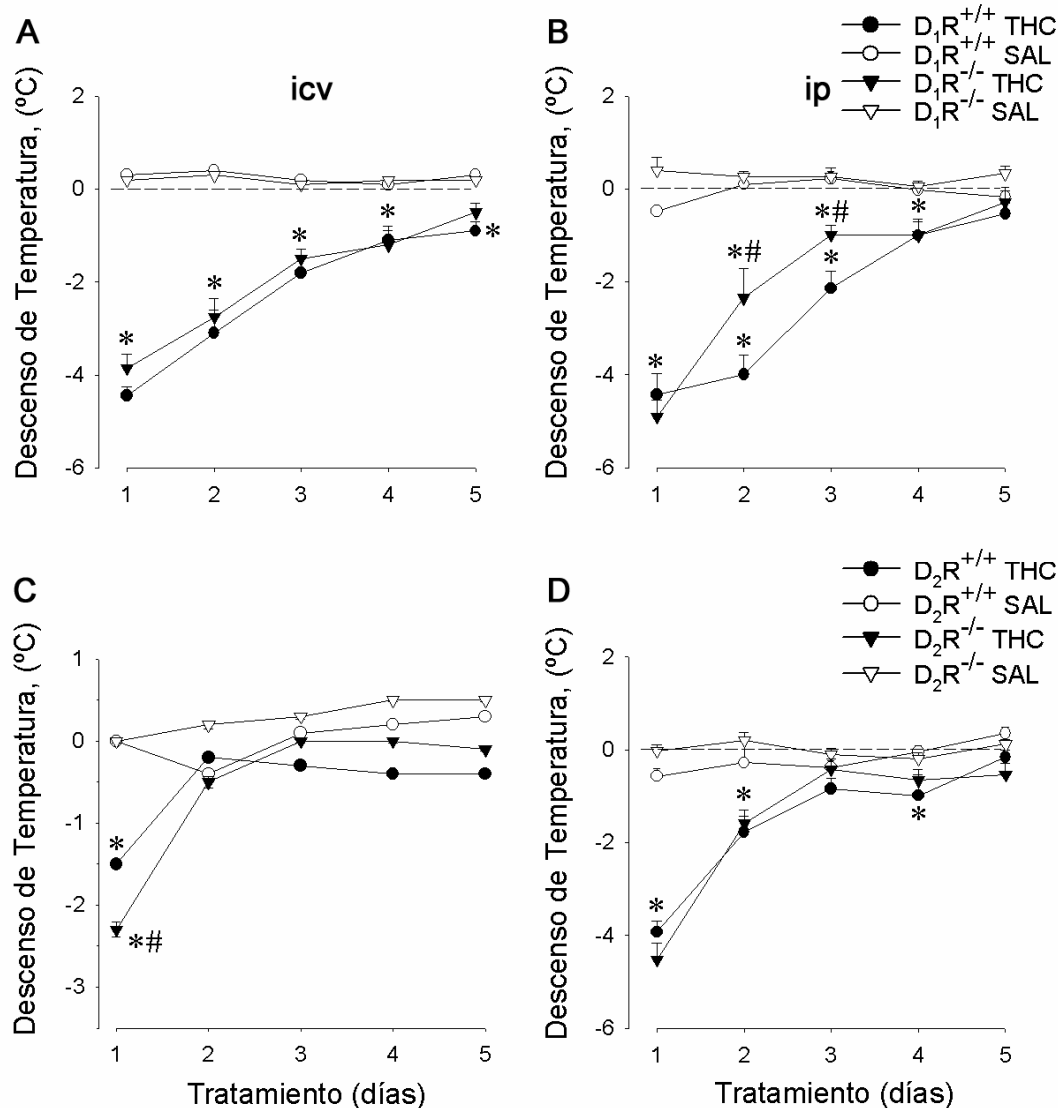
Estos resultados demostraron que el receptor D<sub>1</sub> está implicado en el efecto analgésico, pero no en el desarrollo de tolerancia inducido por la administración crónica de THC, mientras que el receptor D<sub>2</sub> ni está implicado en el efecto analgésico ni en el desarrollo de tolerancia inducido por el THC.

#### 4.3. Impacto de la inactivación de los receptores dopaminérgicos sobre el efecto hipotérmico inducido por THC.

Se realizaron estudios sobre el **efecto hipotérmico** inducido por THC en ratones D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> observándose un descenso de temperatura similar entre los distintos grupos experimentales. La tolerancia a la hipotermia inducida por THC se observó en ambos grupos pero apareció antes en los ratones D<sub>2</sub> (D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup> y D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>) que en los D<sub>1</sub> (D<sub>1</sub>R<sup>+/+</sup> y D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>).

El mayor efecto hipotérmico en los ratones D<sub>1</sub> se alcanzó con el tratamiento agudo (icv e ip), disminuyendo a lo largo del tratamiento crónico y desarrollando tolerancia a partir del día 5 del tratamiento (Fig 24A, B). Con la administración icv la temperatura disminuyó por igual en ratones D<sub>1</sub>R<sup>+/+</sup> y D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>, sin embargo, por vía sistémica, se observó un descenso menos significativo en ratones D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> los días 2 y 3 del tratamiento crónico. En los ratones D<sub>2</sub> los resultados obtenidos muestran un mayor descenso de temperatura con el tratamiento agudo (icv e ip). El desarrollo de tolerancia fue ya evidente al segundo día del tratamiento (Fig 24C, D). Entre los ratones D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup> y D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> tratados con THC, no se observaron diferencias significativas en el efecto hipotérmico, excepto en el tratamiento agudo icv en el que se registró un mayor efecto hipotérmico en los ratones D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>.

Por tanto, los resultados obtenidos demuestran que el receptor D<sub>1</sub> está implicado en el descenso de temperatura pero no en el desarrollo de tolerancia inducido por la administración crónica de THC, mientras que el receptor D<sub>2</sub> no está implicado ni en el efecto hipotérmico ni en la tolerancia.

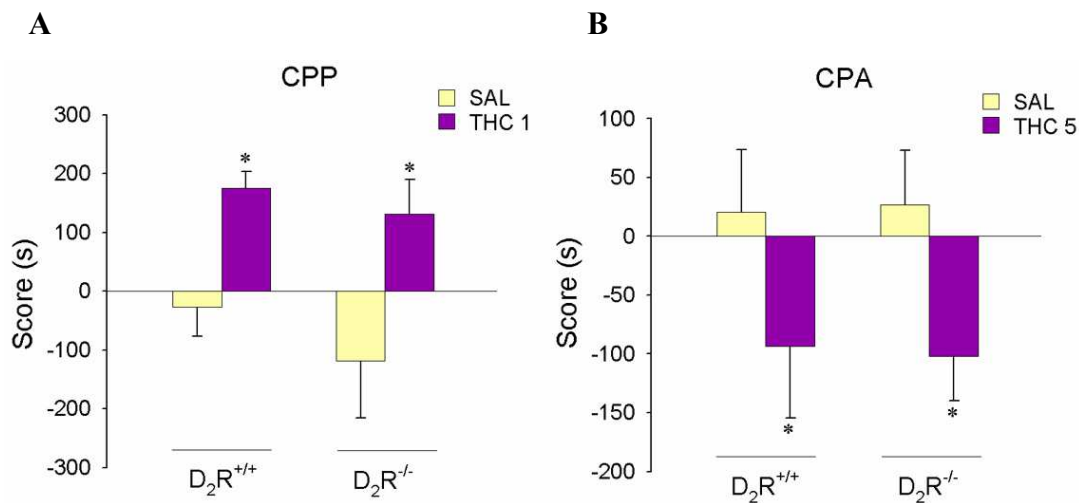


**Figura 24. Implicación de los receptores  $D_1$  y  $D_2$  en el efecto hipotérmico inducido por THC.** El THC icv (10  $\mu$ g en dos dosis diarias en un volumen de 4  $\mu$ l) e ip (10 mg/kg) indujo hipotermia en ratones  $D_1$  y  $D_2$ , alcanzando el máximo con el tratamiento agudo. La inactivación del receptor  $D_1$  disminuye el efecto hipotérmico del THC, aunque no afecta al desarrollo de tolerancia. La inactivación de  $D_2$  no modificó ni la hipotermia ni la tolerancia inducida por THC. Diferencias significativas: \*  $p < 0.05$  vs SAL y #  $p < 0.05$  vs  $D_1R^{+/+}$  o  $D_2R^{+/+}$ , según ANOVA de dos factores con medidas repetidas seguida por un test de Tukey *post-hoc*,  $n=6-10$ .

#### 4.4. Implicación del receptor dopaminérgico D<sub>2</sub> en los efectos motivacionales inducidos por la administración de THC.

Los receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> tienen gran importancia en los efectos reforzantes inducidos por las drogas de abuso, por tanto, evaluamos la implicación de dichos receptores en los efectos motivacionales inducidos por la administración de THC, basados en el modelo de preferencia espacial condicionada en función de las dosis empleadas.

El tratamiento con THC (1 mg/kg, ip) indujo preferencia espacial condicionada en ratones D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup> y D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> (Fig 25A). El test estadístico ANOVA de dos factores reveló un efecto significativo del tratamiento con THC ( $F_{1,59}= 12.83$ ,  $p<0.001$ ), pero no se observó un efecto significativo entre genotipos ( $F_{1,59}= 0.39$ , n.s.) ni interacciones entre el genotipo y el tratamiento ( $F_{1,59}= 0.60$ , n.s.). Se realizó una ANOVA de un factor observándose diferencias significativas en ratones D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup> y D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> tratados con THC y salino (Fig 25A).



**Figura 25. El receptor dopaminérgico D<sub>2</sub> no está implicado en los efectos motivacionales inducidos por THC.** Se evaluaron los efectos de recompensa de THC (1mg/kg) (A) o los efectos aversivos (5mg/kg) (B) en ratones D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup> y D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>. El eje vertical representa la medida de preferencia o aversión espacial calculada como el tiempo (segundos) empleado en el compartimento condicionado en el día del test menos el tiempo empleado en el mismo compartimento en los días de preconditionamiento. Los datos se expresaron como medias  $\pm$  SEM (n= 12-15). A \* $p<0.01$  D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup> vs SAL; \* $p<0.05$  D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> vs SAL, B \* $p<0.05$  D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup> y D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> vs SAL.

Se evaluaron los efectos aversivos del THC (5 mg/kg, ip) en ratones  $D_2R^{+/+}$  y  $D_2R^{-/-}$  (Fig 25B). El test estadístico ANOVA de dos factores reveló un efecto significativo del tratamiento con THC ( $F_{1,54}= 5.66$ ,  $p<0.05$ ), pero no se observó un efecto significativo del genotipo ( $F_{1,54}= 0.007$ , n.s.) ni interacciones entre el genotipo y el tratamiento ( $F_{1,54}= 0.002$ , n.s.). Se realizó una ANOVA de un factor observándose un efecto aversivo en ratones  $D_2R^{+/+}$  y  $D_2R^{-/-}$  tratados con THC (Fig 25B).

Por tanto, estos resultados demuestran que el receptor dopaminérgico  $D_2$  no participa en los efectos motivacionales inducidos por THC evaluados con el modelo de preferencia o aversión espacial.

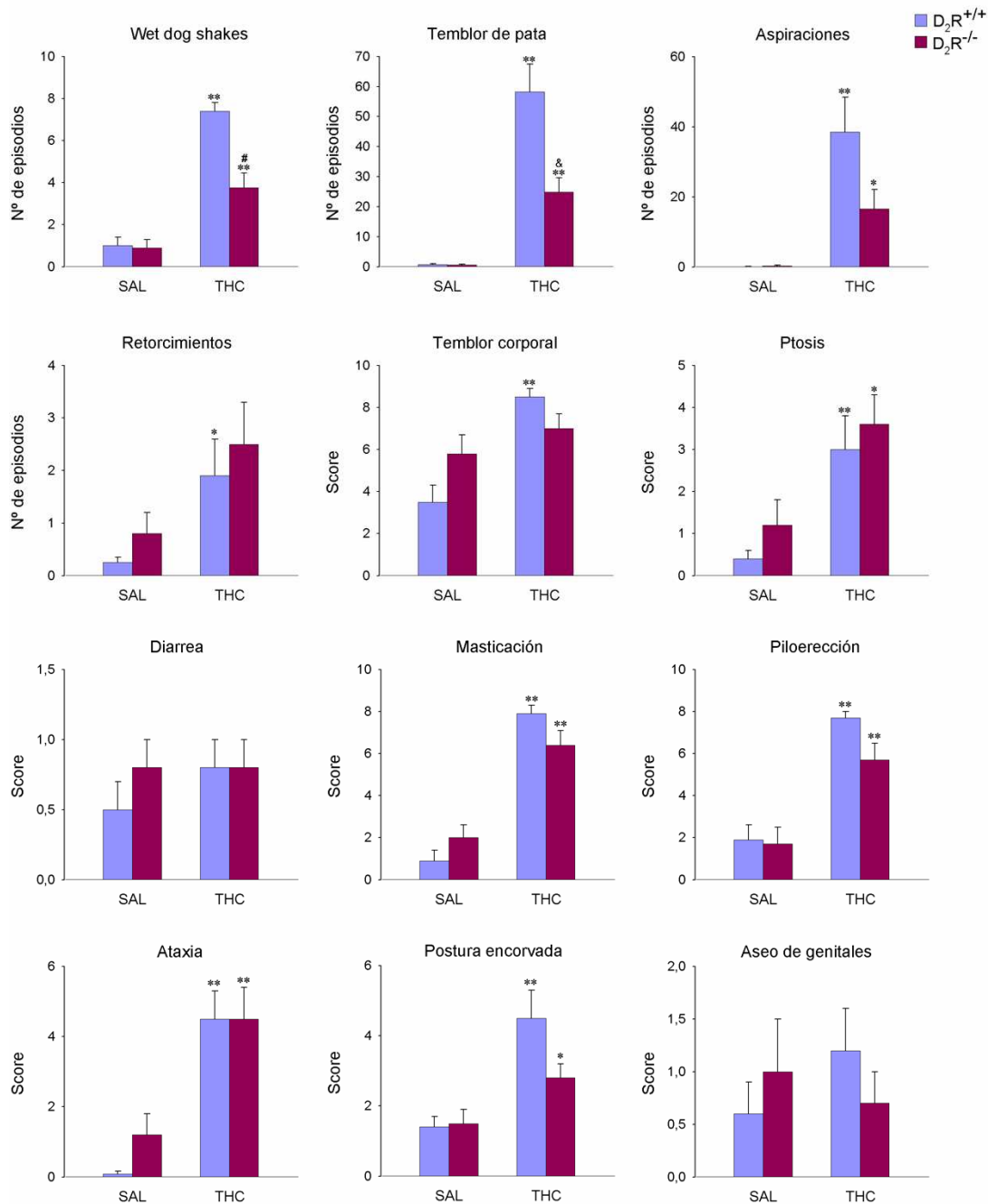
#### **4.5. Implicación del receptor dopaminérgico $D_2$ en los efectos de dependencia inducidos por la administración de THC.**

A continuación se realizaron estudios sobre el **síndrome de abstinencia** a cannabinoides en ratones  $D_2R^{+/+}$  y  $D_2R^{-/-}$ , para evaluar si existe un componente dopaminérgico en las manifestaciones somáticas de la abstinencia a THC.

Los ratones tratados con THC (20 mg/kg x 2, ip durante 5 días) o salino se desafiaron con el antagonista cannabinoide SR 141716A (10 mg/kg, ip), con el objeto de precipitar el síndrome de abstinencia. Durante el periodo de observación anterior a la inyección del antagonista (15 min), no se observaron síntomas de abstinencia en ninguno de los grupos experimentales. En los 45 minutos posteriores a la inyección se constató una expresión significativa de los diferentes signos de abstinencia, tanto en ratones  $D_2R^{+/+}$  como  $D_2R^{-/-}$  (Fig 26A), como se ha descrito anteriormente en distintos trabajos (Hutcheson y cols, 1998; Ledent y cols, 1999).



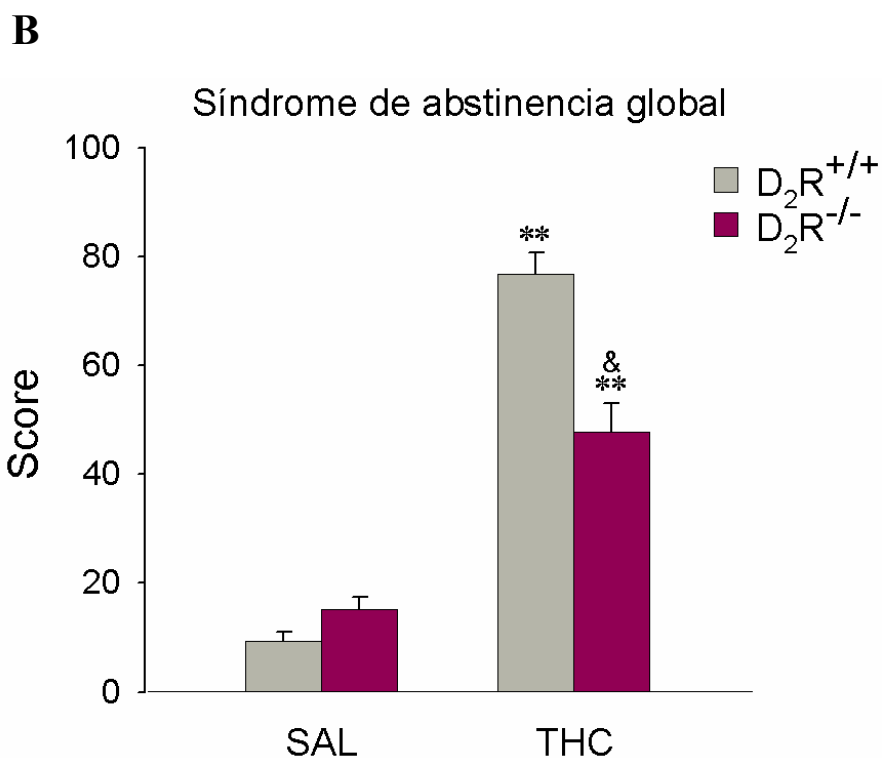
A



**Figura 26A. La inactivación del receptor dopaminérgico D<sub>2</sub> disminuyó el síndrome de abstinencia a THC precipitado por SR 141716A.** El síndrome de abstinencia se precipitó con la administración de SR 141716A (10 mg/kg, ip) en ratones que recibieron un tratamiento crónico THC (20 mg/kg x 2 ip). Se cuantificaron las sacudidas de tronco y cabeza, temblor en las patas, retorcimientos y aspiraciones y se chequeó la aparición de ptosis, temblor corporal, aseo de los genitales en exceso o erección, piloerección, ataxia, diarrea, masticación y postura encorvada durante los 45 minutos posteriores a la inyección del antagonista. Los datos se expresaron como medias  $\pm$  SEM (n= 12-13). Los histogramas azules representan a los ratones D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup> y los rojos a los ratones D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>. ANOVA de un factor (\*p<0.05, \*\*p<0.01 vs SAL; # p<0.05, & p<0.01 vs D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup>).

La expresión del síndrome de abstinencia en ratones carentes del receptor  $D_2$  fue menor que en los ratones de fenotipo salvaje. En los ratones  $D_2R^{-/-}$  tratados con THC se observó un gran aumento con respecto a los salinos en las sacudidas de tronco y cabeza, temblor de patas, masticación, piloerección, ataxia y síndrome de abstinencia global (Fig 26A, B). En otros parámetros como la postura encorvada, sniffing o aspiraciones y ptosis parpebral el aumento fue menor y en el resto de parámetros estudiados no se observó variación. En los ratones  $D_2R^{+/+}$  tratados con THC aumentaron todos los parámetros estudiados excepto la diarrea y aseo de genitales.

Entre los ratones  $D_2R^{+/+}$  y  $D_2R^{-/-}$  tratados con THC, se comparó la expresión de los distintos signos de abstinencia, observándose en los ratones  $D_2R^{-/-}$  una expresión menor de las sacudidas de tronco y cabeza, temblor de patas y del síndrome de abstinencia global (Fig 26A, B).



**Figura 26B. La inactivación del receptor dopaminérgico  $D_2$  disminuyó el síndrome de abstinencia a THC precipitado por SR 141716A.** La cuantificación del síndrome de abstinencia global, con límites de 0 a 100, se calculó para cada animal dando a cada parámetro individual un valor relativo respecto al 100. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  SEM ( $n = 12-13$ ). Los histogramas grises representan los valores de los ratones  $D_2R^{+/+}$  y los rojos los de los ratones  $D_2R^{-/-}$ . ANOVA de un factor (\*\* $p < 0.01$  vs SAL; &  $p < 0.01$  vs  $D_2R^{+/+}$ ).

Los resultados anteriores mostraron una disminución significativa de la severidad de la abstinencia de THC en los ratones  $D_2R^{-/-}$  en el *score* global de abstinencia y en ocho de los doce signos individuales estudiados. Por tanto, los receptores  $D_2$  son importantes para la completa manifestación de la sintomatología somática de la abstinencia.

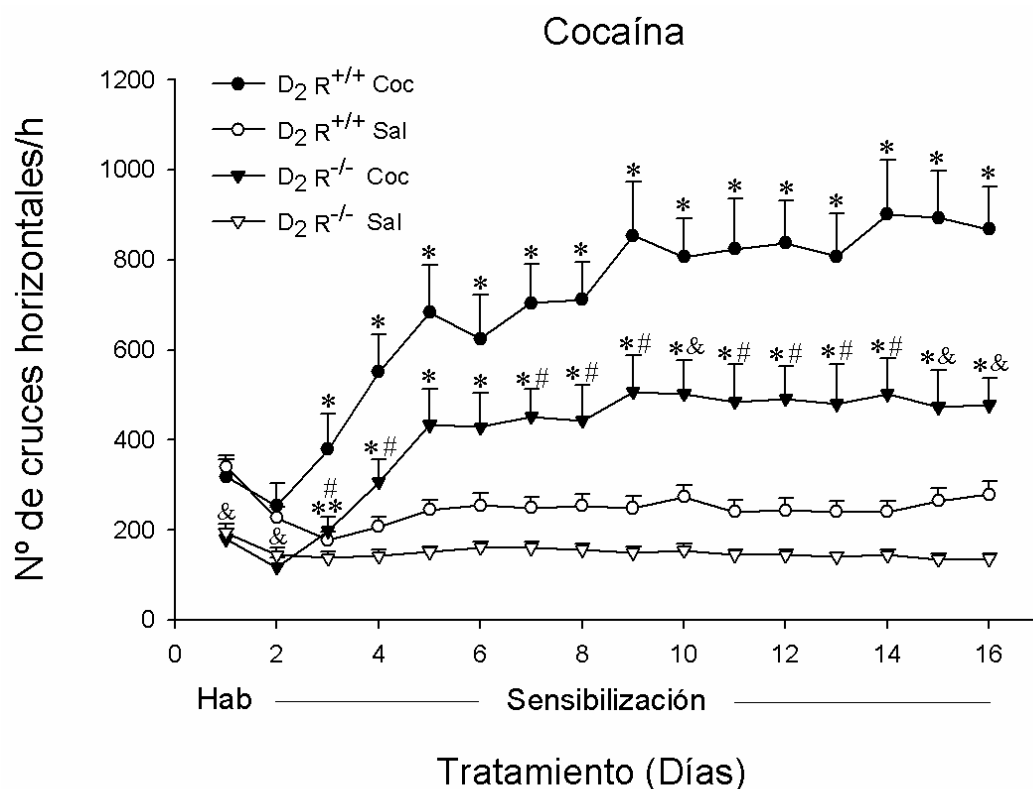
## **5. IMPACTO DE LA INACTIVACIÓN DEL RECEPTOR $D_2$ EN LAS ACCIONES DE LOS PSICOESTIMULANTES.**

Los psicoestimulantes, cocaína y anfetamina, son agentes dopaminérgicos indirectos que aumentan la concentración de dopamina en la sinapsis nerviosa, bien bloqueando la recaptación de catecolaminas como dopamina, adrenalina y noradrenalina (cocaína) o bien aumentando su liberación (anfetamina). Por tanto, sus acciones están mediadas en gran parte por los receptores dopaminérgicos. Para profundizar en el papel de los receptores dopaminérgicos  $D_2$  sobre los efectos comportamentales y moleculares inducidos por el consumo de psicoestimulantes, se realizaron los experimentos que se detallan a continuación en ratones  $D_2R^{+/+}$  y  $D_2R^{-/-}$ .

### **5.1. La sensibilización comportamental inducida por cocaína y anfetamina es anormal en ratones $D_2R^{-/-}$ .**

Experimentos conductuales anteriores han demostrado que administraciones repetidas de cocaína incrementan progresivamente la actividad locomotora en ratones (Martín y cols., 2000), provocando un fenómeno llamado sensibilización motora o comportamental. Dicho fenómeno se prolonga en el tiempo y podría ser la base de la drogadicción (Robinson y Berridge, 1993; Moratalla y cols., 1996a).

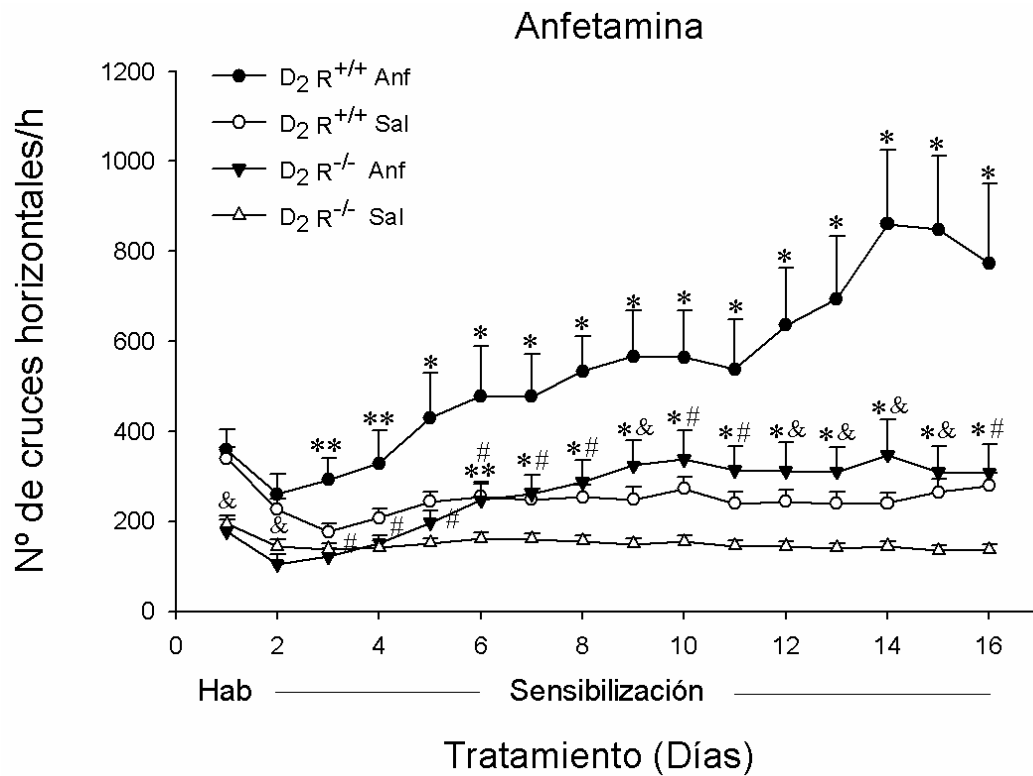
Se realizaron **estudios de sensibilización motora a cocaína y anfetamina** en ratones  $D_2R^{+/+}$  y  $D_2R^{-/-}$ , para evaluar el papel de los receptores dopaminérgicos  $D_2$  en dicha sensibilización inducida por la administración repetida de ambos psicoestimulantes.



**Figura 27. La inactivación de los receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> disminuye la actividad locomotora inducida por cocaína.** Los grupos experimentales se habituaron durante dos días a las cajas de actividad. La sensibilización conductual fue significativa a partir del día 5 del tratamiento en adelante y fue menor en los D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> (\*\* p < 0.05, \* p < 0.01 vs Sal y # p < 0.05, & p < 0.01 vs D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup>). Test de Student, n=12-14.

Se procedió, durante 2 días consecutivos, a habituar a los animales de experimentación a las cajas de actividad locomotora, y en el 3<sup>er</sup> día del experimento se llevó a cabo el tratamiento con *cocaína* (10 mg/kg, i.p.) o *anfetamina* (2.5 mg/kg, i.p.). Se evaluó la actividad locomotora durante los 60 minutos posteriores a la inyección de los psicoestimulantes.

El tratamiento con cocaína provocó un aumento significativo de la actividad locomotora en ratones D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup> que se observó ya en el primer día de tratamiento (Día 3 del experimento, Fig 27, \* p < 0.01 vs Sal D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup>). Sin embargo, la ausencia de receptores D<sub>2</sub> en ratones D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> dio lugar a menor área bajo la curva referida al salino (\*\* p < 0.05 vs Sal D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>). Se observaron diferencias significativas en la actividad locomotora entre los ratones D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup> y D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> tratados con cocaína (# p < 0.05 vs D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup>).



**Figura 28. La inactivación de los receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> disminuye la actividad locomotora inducida por anfetamina.** Los grupos experimentales se habituaron durante dos días a las cajas de actividad. La sensibilización conductual fue significativa a partir del día 5 de tratamiento y fue menor en los D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> (\*\* p< 0.05, \* p< 0.01 vs Sal y # p< 0.05, & p< 0.01 vs D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup>). Test de Student, n=12-14. Se observó una sensibilización menor en los ratones D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> tratados con anfetamina.

La anfetamina aumentó de forma significativa la actividad locomotora en ratones D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup> en el primer día de tratamiento (Día 3 del experimento, Fig 28, \*\* p< 0.05 vs Sal D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup>). Sin embargo, en ratones D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> se observó una inhibición del efecto motor de anfetamina, de modo que en los ratones D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> la anfetamina apenas tuvo efecto, observándose una actividad motora similar a la de los ratones tratados con salino. Se observaron diferencias significativas en el efecto motor inducido por anfetamina entre los ratones D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup> y D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> (# p< 0.05 vs D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup>).

El *tratamiento crónico* con cocaína y anfetamina aumentó progresivamente la actividad locomotora en los ratones D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup> y D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>, aunque significativamente menos en los ratones D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> (Fig 27 y 28). Curiosamente, la inactivación del receptor D<sub>2</sub> afectó más a la actividad motora inducida por anfetamina que a la de la cocaína, ya que la

disminución motora fue mayor en el experimento con anfetamina que en el de cocaína. Los resultados obtenidos indican que el receptor D<sub>2</sub> está implicado en la sensibilización conductual a psicoestimulantes.

## **5.2. Papel de los receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> en la expresión de genes tempranos inducidos por la administración de cocaína y anfetamina.**

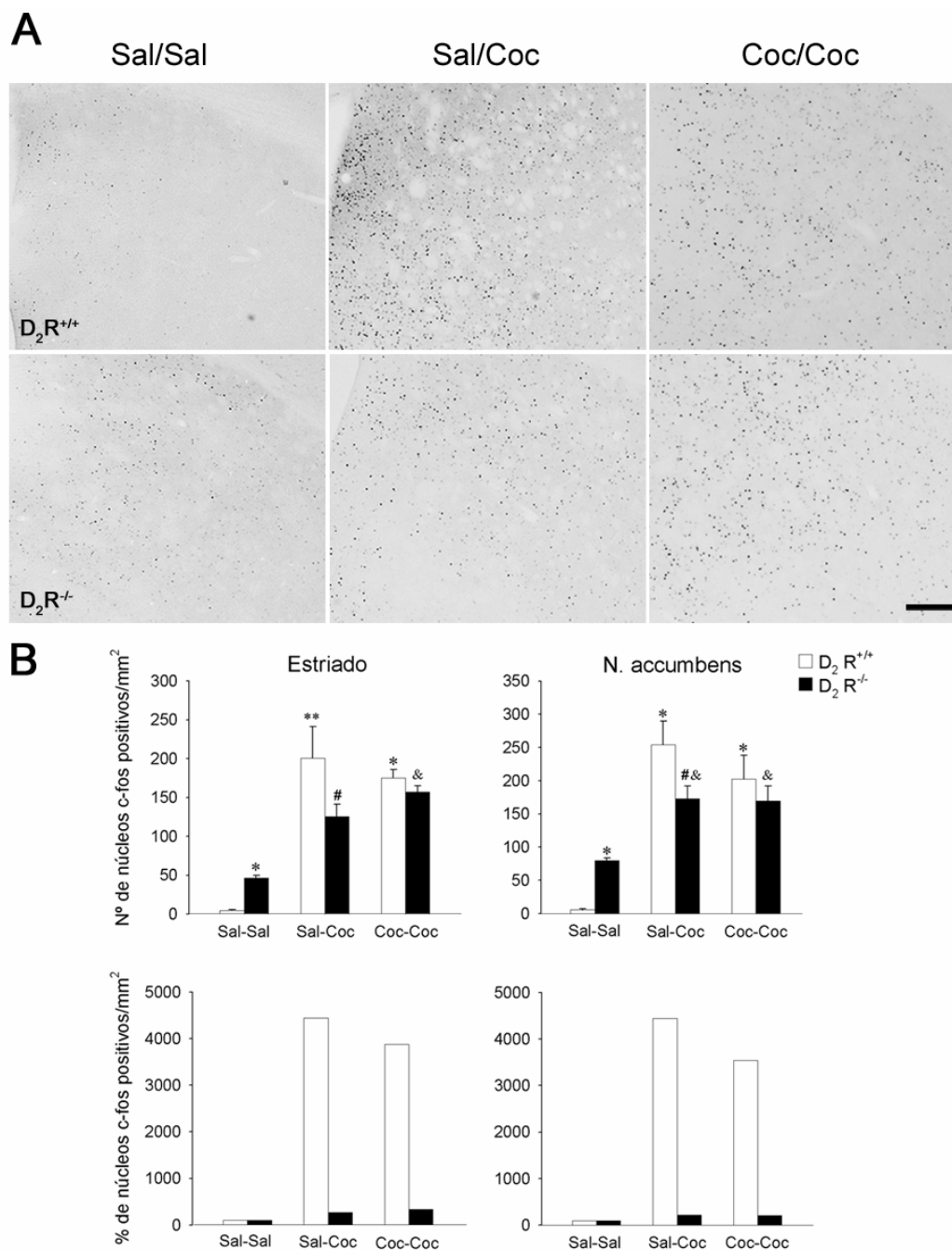
La expresión de genes tempranos, como el c-Fos, se ha utilizado como un marcador fiable de la actividad neuronal. Se ha demostrado que la inactivación de receptores D<sub>1</sub> no sólo bloquea la actividad motora, sino también la expresión de c-Fos inducida por cocaína o anfetamina (Moratalla y cols., 1996b). En este trabajo hemos estudiado el papel del receptor dopaminérgico D<sub>2</sub> en la activación neuronal inducida por cocaína y anfetamina, en el núcleo accumbens y en el estriado mediante la expresión de c-Fos.

Se realizaron estudios inmunohistoquímicos de distribución de núcleos inmunorreactivos a c-Fos, y los resultados obtenidos demostraron que, en condiciones basales, existe una expresión muy baja de c-Fos en el estriado (caudado-putamen) y en el núcleo accumbens de ratones D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup>, presentando algún núcleo aislado en la zona dorsomedial más cercana al ventrículo. Sin embargo, en los ratones D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> se observó una mayor expresión basal de c-Fos en las zona medial, dorsolateral y dorsomedial, siendo esta última la de mayor expresión.

El *tratamiento agudo* con cocaína aumentó significativamente la expresión de c-Fos en el estriado y en el núcleo accumbens de ratones D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup>, observándose mayor número de núcleos, así como más intensos, en las zonas dorsomedial y ventromedial. Este aumento fue menor en ratones D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>, aunque se constató el mismo patrón de distribución. El *tratamiento crónico* con cocaína, en ratones D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup> y D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>, también aumentó la expresión de c-Fos, aunque en menor medida que el agudo y con un patrón de distribución estriatal más uniforme (Fig 29A). Resultados similares se obtuvieron con la anfetamina y ambos resultados concuerdan con otros realizados anteriormente en rata (Moratalla y cols., 1996a). Así, podemos concluir, que existe mayor expresión basal de c-Fos en ratones D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> que en los D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup>. En ratones D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup>, el número de núcleos aumenta con el tratamiento agudo aunque no tanto con el crónico; en cambio, en los ratones D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> aumenta con ambos tratamientos.

La cuantificación de núcleos inmunorreactivos a c-Fos en estriado y núcleo accumbens se llevó a cabo en secciones coronales mediante análisis de imagen con el programa AIS (Imaging Research, Linton, Inglaterra). En condiciones basales, los ratones  $D_2R^{-/-}$  presentaron una expresión de c-Fos mucho más alta que los ratones  $D_2R^{+/+}$ , con lo que resultaron diferencias significativas en la expresión de c-Fos entre los dos genotipos en estriado y núcleo accumbens. El tratamiento agudo y crónico con cocaína aumentó la expresión de c-Fos en estriado y núcleo accumbens en ambos genotipos aunque el aumento fue menor en los ratones  $D_2R^{-/-}$ . En estos ratones, la cocaína, aguda o crónica, aumentó la expresión de c-Fos por encima de los niveles basales pero en menor medida que en los  $D_2R^{+/+}$  (Figura 29B). Se obtuvieron resultados similares en los experimentos con anfetamina.

Para poder apreciar mejor los cambios en la expresión de c-Fos y el impacto de la inactivación del receptor  $D_2$ , calculamos el porcentaje de incremento de la expresión de c-Fos inducida por cocaína, aguda o crónica, en ambos genotipos en comparación con la expresión basal. En ratones  $D_2R^{+/+}$ , el incremento porcentual de c-Fos inducido por cocaína aguda y crónica fue muy superior al incremento en los salinos, tanto en el estriado como en el núcleo accumbens. Sin embargo, en los ratones  $D_2R^{-/-}$ , el tratamiento con cocaína no originó un incremento significativo de la expresión de c-Fos en ninguna de las dos estructuras, ya que fue solamente el doble que en los ratones  $D_2R^{-/-}$  tratados con salino (Fig 29B).



**Figura 29. La inactivación del receptor dopaminérgico  $D_2$  disminuye la expresión de c-Fos inducida por cocaína.** **A.** Fotografías de secciones coronales de cerebro de ratón que ilustran la expresión de c-Fos tras la administración de cocaína aguda (Sal/Coc) y crónica (Coc/Coc). Barra de calibración = 200  $\mu$ m. **B.** Los histogramas muestran la cuantificación de la expresión de c-Fos en ratones  $D_2R^{+/+}$  y  $D_2R^{-/-}$  inducida por cocaína expresada en nº de núcleos c-Fos+/mm<sup>2</sup> o en porcentaje frente al grupo control tratado con salino. Los símbolos indican diferencias significativas en el estriado (\*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.001$  vs Sal-Sal  $D_2R^{+/+}$  y #  $p < 0.01$ , &  $p < 0.001$  vs Sal-Sal  $D_2R^{-/-}$ ) y en NAc (\*  $p < 0.001$  vs Sal-Sal  $D_2R^{+/+}$ ; &  $p < 0.01$  vs Sal-Sal  $D_2R^{-/-}$  y #  $p < 0.05$  vs Sal-Coc  $D_2R^{+/+}$ ). Test de Student,  $n=6$ .

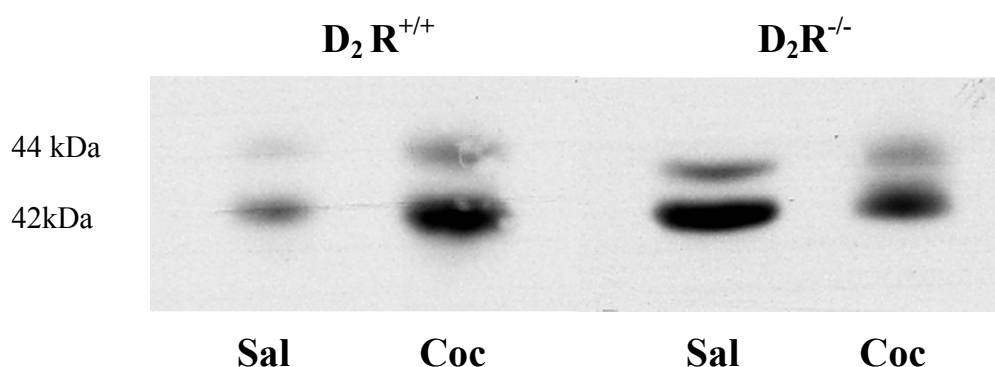


Aunque los ratones  $D_2R^{-/-}$  presentaron una expresión basal mayor que los  $D_2R^{+/+}$ , la inducción del gen de expresión temprana c-fos, originada por cocaína y anfetamina, fue menor tanto en el estriado como en el núcleo accumbens. Por tanto, la inactivación del receptor dopaminérgico  $D_2$  disminuye la expresión de c-Fos inducida por los psicoestimulantes cocaína y anfetamina.

### 5.3. La inactivación del receptor de dopamina $D_2$ disminuye la fosforilación de ERK inducida por cocaína.

Se ha demostrado que, después de un tratamiento con cocaína, la inducción del gen de expresión temprana c-Fos en el estriado depende de la kinasa reguladora de la señal extracelular (ERK). Estudios anteriores demuestran que la administración de SL 327 (inhibidor selectivo de ERK) bloquea la expresión de c-Fos inducida por cocaína (Valjent y cols., 2000).

En los experimentos que se describen a continuación, se determinó el papel del receptor de dopamina  $D_2$  en la activación de ERK1/2 inducido por cocaína. Se llevaron a cabo estudios de Western blot en los que se comparó la fosforilación de ERK entre ratones  $D_2R^{+/+}$  y  $D_2R^{-/-}$ , 20 minutos después de la administración de cocaína (10 mg/kg).



**Figura 30. La inactivación del receptor dopaminérgico  $D_2$  disminuye la fosforilación de ERK inducida por cocaína en el estriado.** Western blot de extracto de proteína estriatal recogida 20 minutos después de la administración de salino (Sal) o cocaína (Coc) en ratones  $D_2R^{+/+}$  y  $D_2R^{-/-}$  frente a un anticuerpo específico de la forma fosforilada de ERK. La inmunorreactividad específica de p-ERK aparece como dos bandas a 42 kDa y 44 kDa. El experimento se realizó al menos tres veces con resultados similares,  $n=3$ .

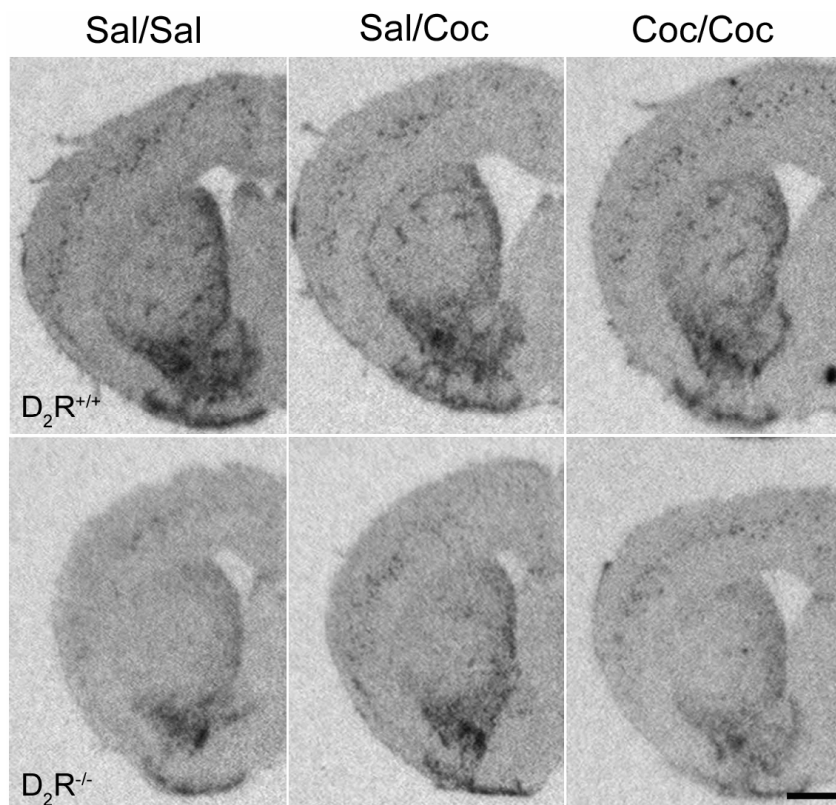
Los datos obtenidos demuestran que los niveles basales de fosforilación de ERK, en estriado, fueron más altos en los ratones  $D_2R^{-/-}$  que en los  $D_2R^{+/+}$  ya que la banda correspondiente a p-ERK fue mayor en los  $D_2R^{-/-}$  (Fig 30). En el estriado, el tratamiento agudo con cocaína dio lugar a un gran aumento de señal en la banda de los ratones  $D_2R^{+/+}$ , sin que en ratones  $D_2R^{-/-}$  se observara un aumento similar. Los resultados anteriores demuestran que los receptores  $D_2$  desempeñan un papel importante en la activación de ERK inducida por cocaína.

#### **5.4. La inactivación del receptor $D_2$ inhibe la expresión de dinorfina basal y la inducida por cocaína o anfetamina en el estriado**

La dinorfina y la encefalina son los principales marcadores de las neuronas estriatales de proyección. Ambos neuropéptidos se regulan mediante el sistema dopaminérgico. Así, la depleción dopaminérgica inducida por 6-Hidroxidopamina (6-OHDA) disminuye la expresión de dinorfina en el estriado lesionado, mientras que la administración de L-DOPA, la aumenta (Pavón y cols., 2006, Darmopil y cols., 2008, 2009). En estudios anteriores se ha demostrado que la expresión de dinorfina basal y la inducida por cocaína está modulada por los receptores dopaminérgicos  $D_1$  (Xu y cols, 1994; Moratalla y cols, 1996b, Drago y cols, 1996, Steiner y Gerfen, 1995).

Para determinar si los receptores  $D_2$  también contribuyen a la modulación de dinorfina, estudiamos su expresión en condiciones basales o la expresión inducida por cocaína en ratones  $D_2R^{-/-}$  en comparación con sus controles, mediante estudios de **hibridación *in situ***. En los experimentos realizados con ratones  $D_2R^{+/+}$  se detectó mayor señal de hibridación en los estriosomas y núcleo accumbens, tanto en animales tratados con salino como en los tratados con cocaína. La señal de hibridación en la matriz fue baja. Sin embargo, en los ratones  $D_2R^{-/-}$ , no se detectaron diferencias entre las distintas estructuras, siendo el marcaje en general, menos intenso que en ratones  $D_2R^{+/+}$  en todas las regiones cerebrales (Fig 31).

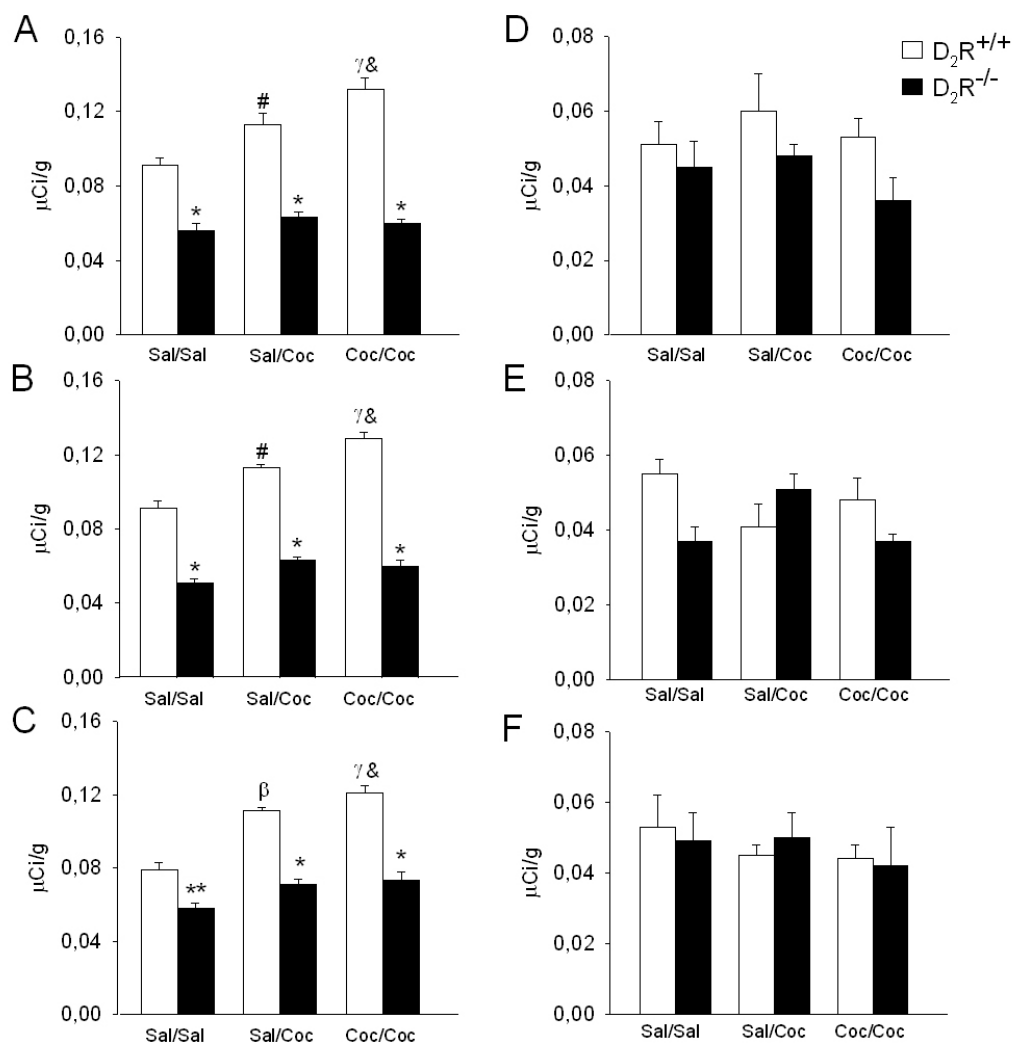
En ratones  $D_2R^{+/+}$ , el tratamiento con cocaína aumentó la expresión del mensajero en los estriosomas, siendo el aumento mayor con el tratamiento crónico que con el agudo. Sin embargo, la cocaína no fue capaz de aumentar los niveles, ya bajos, del mensajero de dinorfina en el estriado de ratones  $D_2R^{-/-}$ , ni siquiera en los estriosomas (Fig 31). Por tanto, estos resultados sugieren que el receptor  $D_2$  modula la expresión de dinorfina basal y también la inducida por cocaína.



**Figura 31. La inactivación del receptor dopaminérgico  $D_2$  disminuyó la expresión del mensajero de dinorfina.** Secciones coronales de cerebro de ratones  $D_2R^{+/+}$  y  $D_2R^{-/-}$ , procesadas mediante hibridación *in situ* para dinorfina. Los ratones se trataron con salino (Sal/Sal), cocaína aguda (Sal/Coc) y cocaína crónica (Coc/Coc). Barra de calibración = 1 mm.

Se realizaron estudios de cuantificación del ARNm de dinorfina en el estriado (estriosomas y matriz) y núcleo accumbens de ratones  $D_2R^{+/+}$  y  $D_2R^{-/-}$  para evaluar la disminución de dinorfina inducida por la inactivación de  $D_2$ . La cuantificación se llevó a cabo en las tres zonas del estriado (rostral, media y caudal) de ratones tratados con salino, cocaína aguda y crónica.

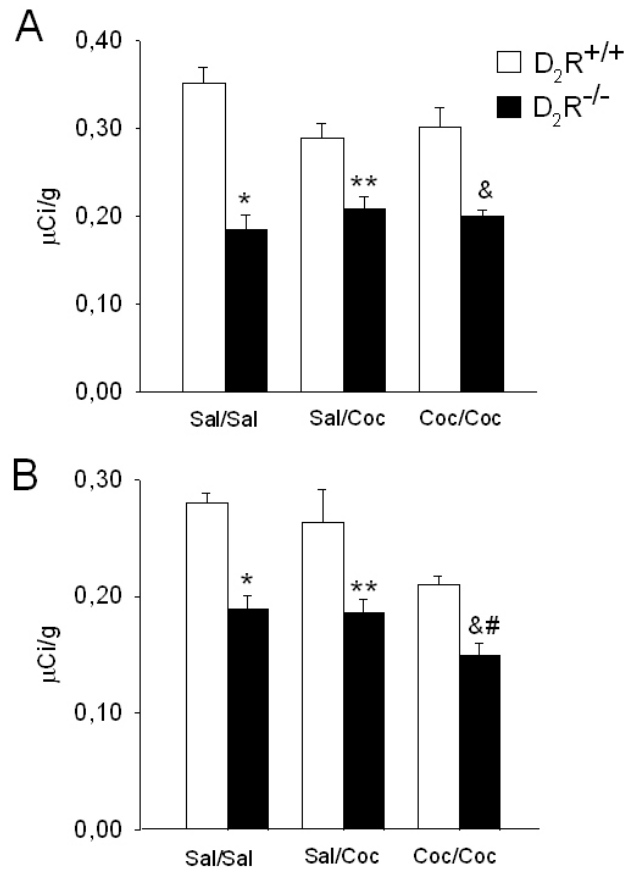
En los estriosomas de los ratones  $D_2R^{+/+}$ , el tratamiento con cocaína aumentó significativamente los niveles del mensajero de dinorfina en las tres zonas citadas del estriado, tras los tratamientos agudo y crónico. Sin embargo, la cocaína no aumentó significativamente los niveles del mensajero en los ratones  $D_2R^{-/-}$  tras ambos tratamientos. En general, se obtuvo una disminución significativa del mensajero de dinorfina en animales  $D_2R^{-/-}$  con respecto a los animales  $D_2R^{+/+}$  en todas las regiones estudiadas y en todos los tratamientos (Fig 32A, rostral; 32B, media y 32C, caudal).



**Fig. 32. La inactivación del receptor dopaminérgico  $D_2$  inhibió el aumento del ARNm de dinorfina inducido por cocaína en estriosomes.** Cuantificación de la expresión del ARNm de dinorfina en ratones  $D_2R^{+/+}$  y  $D_2R^{-/-}$  inducida por cocaína. Se representa la media  $\pm$  ESM de los niveles del mensajero en los estriosomes (rostral-A, medio-B, caudal-C) y matriz (rostral-D, medio-E, caudal-F) del estriado de ratones  $D_2R^{+/+}$  (histogramas blancos) y  $D_2R^{-/-}$  (histogramas negros). La inactivación del receptor  $D_2$  disminuye la dinorfina en los estriosomes del estriado (\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$  vs  $D_2R^{+/+}$ ). En los ratones  $D_2R^{+/+}$ , la cocaína aumentó la expresión de dinorfina en los estriosomes (#  $p < 0.01$ , β  $p < 0.001$ , &  $p < 0.001$  vs  $D_2R^{+/+}$  Sal/Sal; γ al menos  $p < 0.05$  vs  $D_2R^{+/+}$  Sal/Coc). En los ratones  $D_2R^{-/-}$ , la cocaína no aumentó los niveles de dinorfina en los estriosomes. No se observaron diferencias significativas en la expresión de dinorfina en la matriz de ratones  $D_2R^{+/+}$  y  $D_2R^{-/-}$ . ANOVA,  $n=8$ .

En la matriz, no se observaron diferencias significativas en la expresión del mensajero de dinorfina en las distintas zonas del estriado, ni entre los distintos tratamientos, ni entre los dos genotipos de ratones estudiados (Fig 32D, rostral; 32E, media y 32F, caudal).

También se cuantificó la expresión del mensajero de dinorfina en el núcleo accumbens (NAc) rostral y medio, tras el tratamiento agudo y crónico con cocaína.



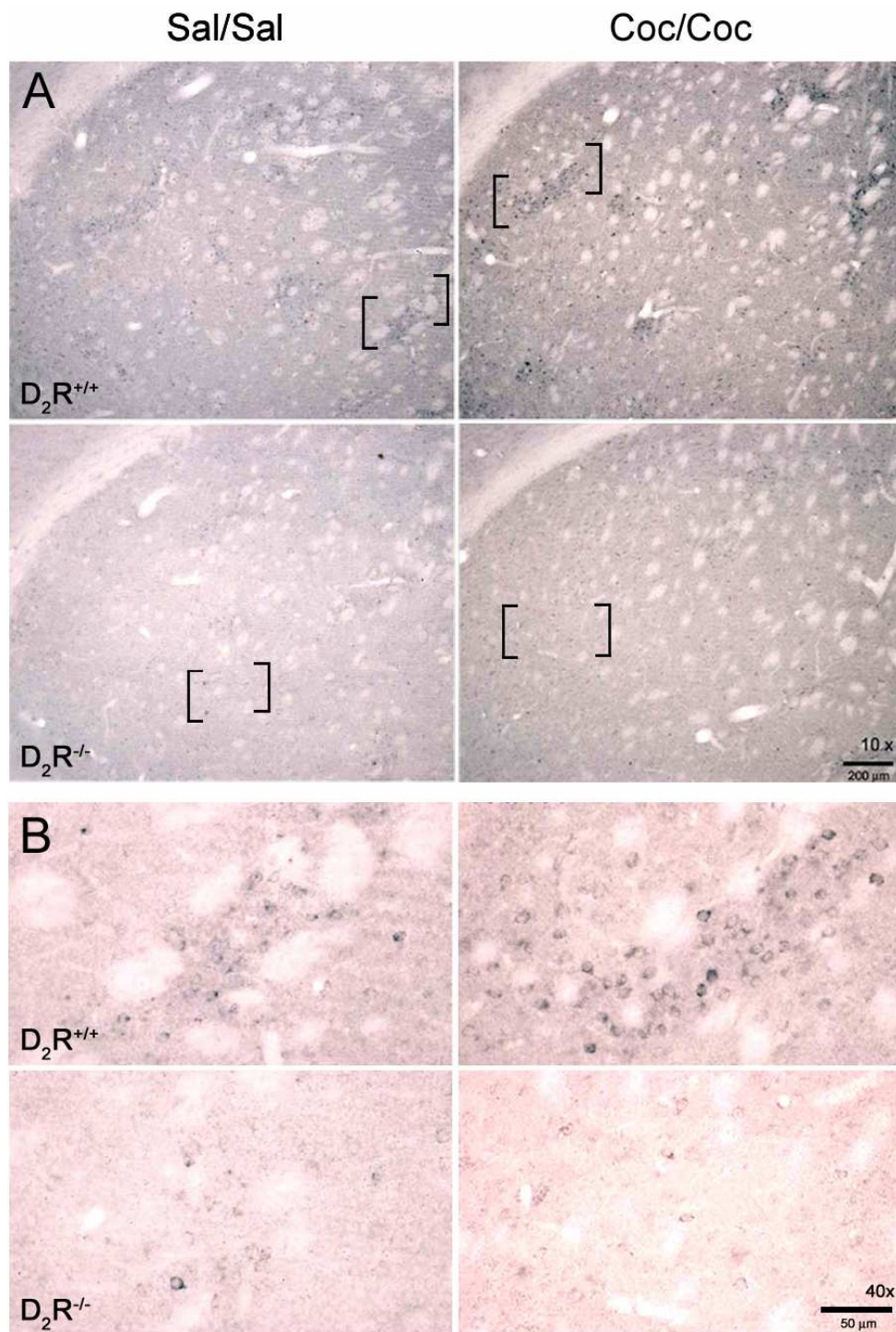
**Figura 33. La inactivación del receptor dopaminérgico  $D_2$  disminuyó la expresión de dinorfina en el NAc.** Cuantificación de la expresión del ARNm de dinorfina en ratones  $D_2R^{+/+}$  y  $D_2R^{-/-}$ . Se representa la media  $\pm$  ESM de los niveles del mensajero en el NAc de ratones  $D_2R^{+/+}$  (histogramas blancos) y  $D_2R^{-/-}$  (histogramas negros) a nivel rostral (A) y medio (B). La inactivación del receptor  $D_2$  disminuye la expresión de dinorfina en el NAc. En los  $D_2R^{-/-}$ , la cocaína crónica disminuyó los niveles de dinorfina a nivel medio. \*  $p < 0.001$  vs  $D_2R^{+/+}$  Sal/Sal, \*\* al menos  $p < 0.05$  vs  $D_2R^{+/+}$  Sal/Coc, & al menos  $p < 0.01$  vs  $D_2R^{+/+}$  Coc/Coc, #  $p < 0.05$  vs  $D_2R^{-/-}$  Sal/Sal y Sal/Coc. ANOVA,  $n=8$ .

En ratones  $D_2R^{+/+}$ , la expresión del mensajero de dinorfina en el NAc rostral y medio no varió tras el tratamiento agudo y crónico. Sin embargo, igual que en los estriosomes, los ratones  $D_2R^{-/-}$  mostraron niveles de expresión mas bajos que los ratones  $D_2R^{+/+}$  en todos los grupos experimentales. En los ratones  $D_2R^{-/-}$  solamente se observó una disminución significativa de la expresión de dinorfina en el tratamiento crónico (Fig 33A, rostral y 33B, medio). Estos resultados demostraron, que al igual que en los estriosomes, la inactivación del receptor  $D_2$  disminuyó la expresión del mensajero de dinorfina.

Con el objeto de determinar si la disminución del mensajero en el estriado se traduce en una disminución de la proteína, se llevaron a cabo experimentos de **inmunohistoquímica** en ratones  $D_2R^{+/+}$  y  $D_2R^{-/-}$  tratados con salino, cocaína aguda o cocaína crónica (10 mg/kg, ip).

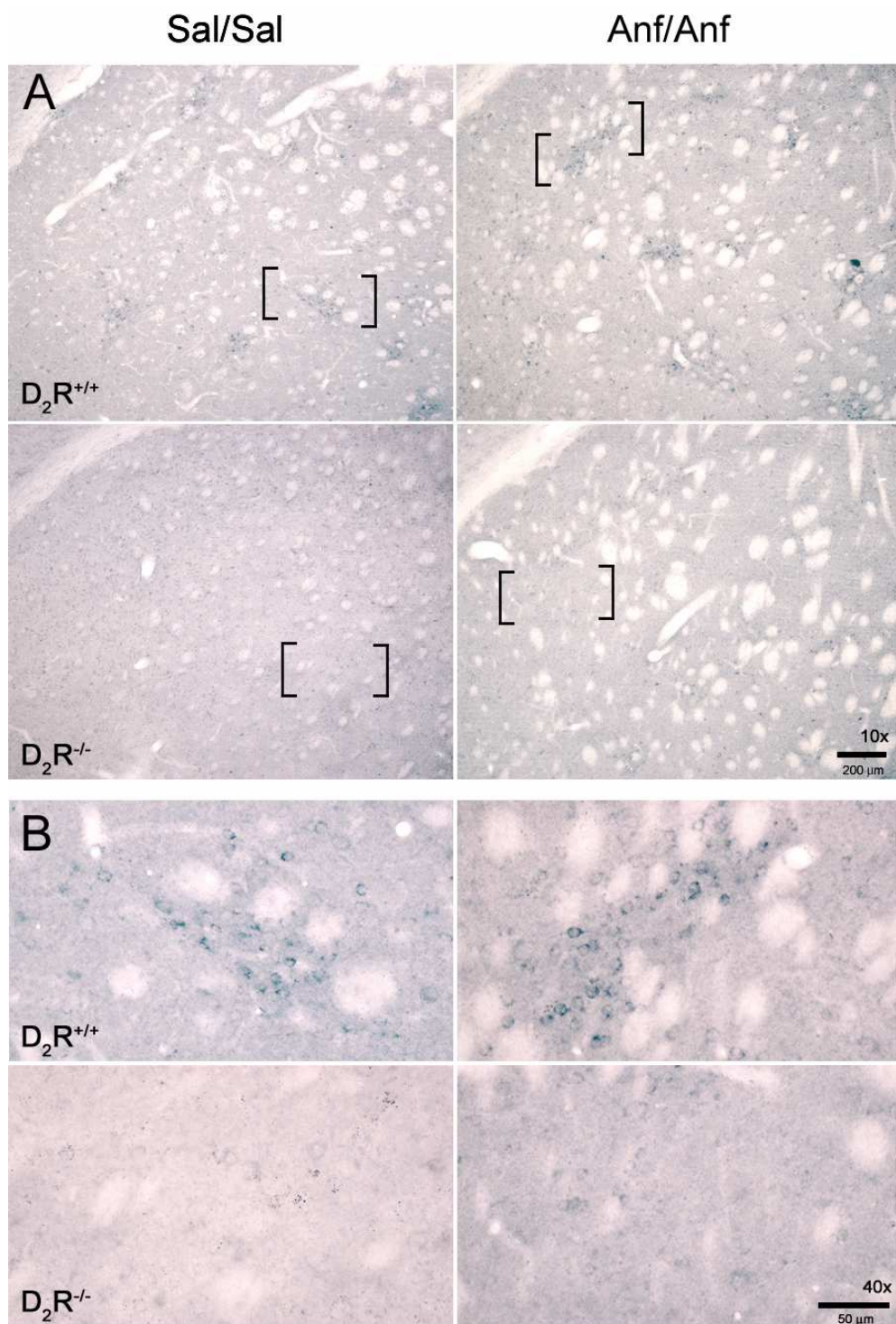
En los ratones  $D_2R^{+/+}$  tratados con salino, se observó el patrón característico de expresión de dinorfina en el estriado, mayor expresión en los estriosomas que en la matriz. En el caudado-putamen el marcaje se distribuyó en los cuerpos neuronales, mientras que en el núcleo accumbens fue en el neuropilo. El tratamiento con cocaína aumentó la inmunorreactividad a dinorfina, principalmente en los estriosomas (Fig 34A, B), observando el aumento más intenso en los estriosomas del estriado dorsal y el más moderado en los de la parte ventral. En la matriz se observó un aumento mucho menor, observándose principalmente en neuronas dispersas.

En los ratones  $D_2R^{-/-}$  tratados con salino, apenas se pudieron distinguir los estriosomas y algunas neuronas dispersas en el estriado. La pérdida de los estriosomas fue particularmente pronunciada en la parte dorsolateral y menos evidente en la ventral, observándose algunas agrupaciones de neuronas dinorfina-positivas menos intensas que las de los ratones  $D_2R^{+/+}$ . En la matriz también se observó un descenso de marcaje. El tratamiento con cocaína no aumentó el marcaje con dinorfina en ninguna de las estructuras (Fig 34A, B). Estos resultados confirman los obtenidos en los experimentos de hibridación *in situ*, ya que la distribución observada en los estudios inmunohistoquímicos en ratones  $D_2R^{-/-}$  presentó una fuerte correlación con los niveles de expresión y la distribución anatómica del ARNm de dinorfina.



**Figura 34. La inactivación del receptor dopaminérgico D<sub>2</sub> disminuyó la expresión de dinorfina inducida por cocaína en el estriado.** Secciones coronales de cerebros de ratones D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup> y D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> que ilustran la expresión de dinorfina tras un tratamiento crónico con cocaína. **A.** Imágenes (10x) donde se observa mayor expresión de dinorfina en los estriosomas de ratones D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup> tratados con salino o con cocaína, mientras que en los ratones D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> la expresión de dinorfina fue prácticamente imperceptible. **B.** Detalle (40x) de la expresión de dinorfina en estriosomas de ratones D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup> y en un área similar en ratones D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>, ya que no se observaron estriosomas. Barras de calibración: 200 μm en A y 50 μm en B.





**Fig 35. La inactivación del receptor dopaminérgico D<sub>2</sub> disminuyó la expresión de dinorfina inducida por anfetamina en el estriado.** Secciones coronales de cerebros de ratones D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup> y D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> que ilustran la expresión de dinorfina tras un tratamiento crónico con anfetamina. **A.** Imágenes (10x) donde se observa mayor expresión de dinorfina en los estriosomas de ratones D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup> tratados con salino o con anfetamina, mientras que en los ratones D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> la expresión de dinorfina fue prácticamente imperceptible. **B.** Detalle (40x) de la expresión de dinorfina en estriosomas de ratones D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup> y en un área similar en ratones D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>, ya que no se observaron estriosomas. Barras de calibración: 200 μm en A y 50 μm en B.

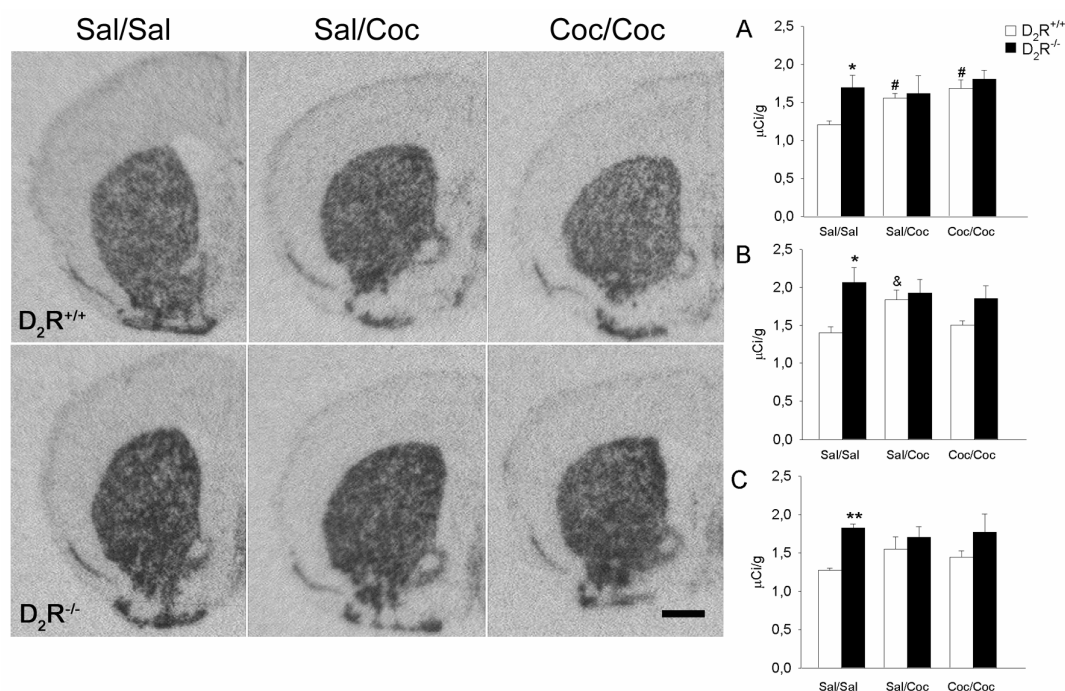


Se obtuvieron resultados similares con anfetamina, la inactivación del receptor D<sub>2</sub> bloqueó el aumento de dinorfina inducido por 2.5 mg/kg de anfetamina aguda o crónica (Fig 35).

En definitiva, estos resultados demuestran que la activación de los receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> es necesaria tanto para la expresión basal de dinorfina como para la expresión inducida por cocaína y anfetamina en el estriado. Como se ha demostrado en estudios previos, el receptor D<sub>1</sub> no sólo colocaliza con dinorfina, sino que también regula su expresión, por tanto, nuestros resultados indican que el receptor D<sub>2</sub>, a pesar de localizarse en las neuronas estriatales de proyección de la vía indirecta, también contribuye a la expresión de dinorfina en las neuronas de la vía directa. Por otro lado, nuestros resultados también demuestran que la disminución de dinorfina se produce durante la etapa de transcripción del ARN mensajero.

### 5.5. La inactivación del receptor $D_2$ aumenta la expresión basal de encefalina en el estriado, pero no la inducida por cocaína: Estudio en ratones $D_2R^{-/-}$ .

Mediante estudios de hibridación *in situ* demostramos que la expresión basal de encefalina fue más intensa en los ratones  $D_2R^{-/-}$  que en los  $D_2R^{+/+}$  en todas las zonas del estriado: rostral, media y caudal. La administración de cocaína aguda o crónica no aumentó los niveles de expresión de encefalina en el estriado de ratones  $D_2R^{-/-}$  en comparación con sus respectivos  $D_2R^{+/+}$ . De hecho, los niveles de encefalina en ratones  $D_2R^{-/-}$  no se modificaron con el tratamiento. Sin embargo, en los ratones  $D_2R^{+/+}$  la encefalina aumentó con la administración aguda y crónica a nivel rostral y solamente con la administración aguda a nivel medio (Fig 36).



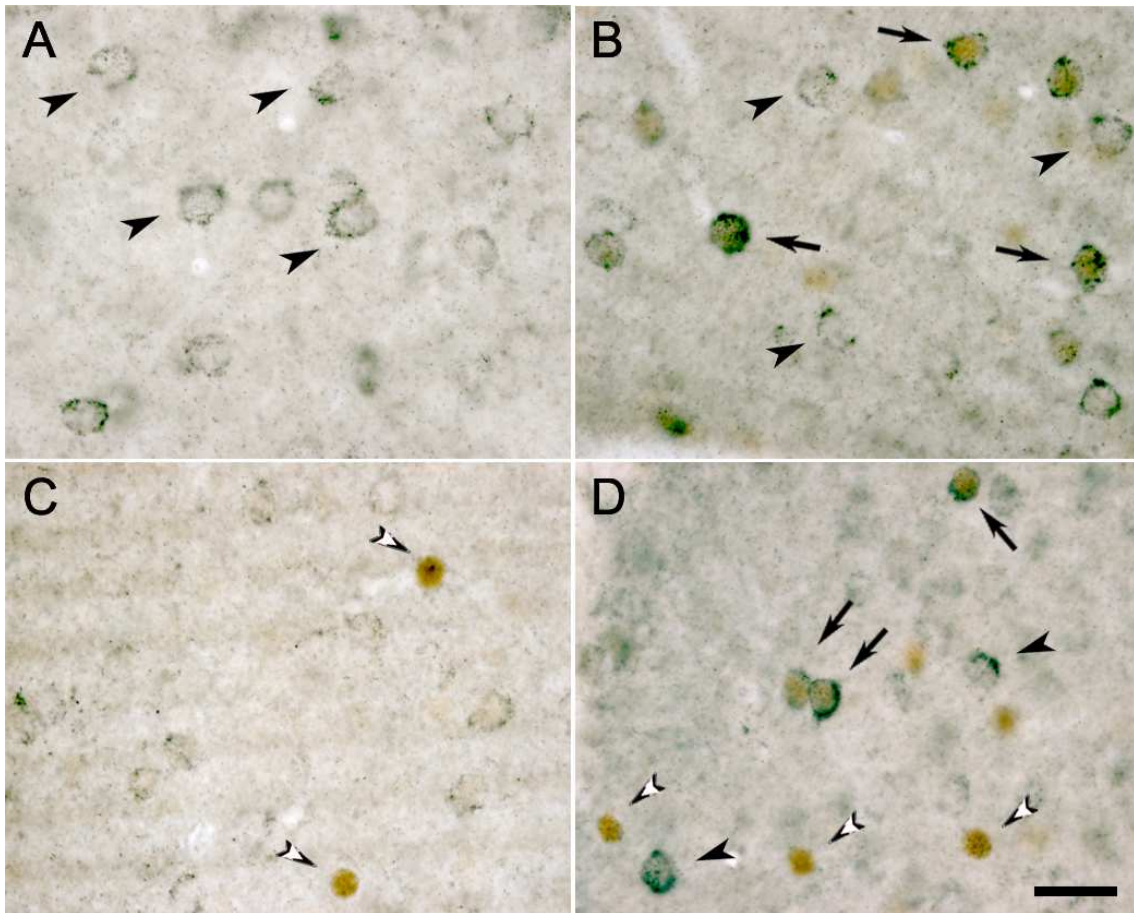
**Figura 36. La inactivación del receptor dopaminérgico  $D_2$  aumenta la expresión basal de encefalina, pero no la inducida por cocaína.** Fotografías de secciones coronales de cerebro medio de ratón procesadas mediante hibridación *in situ* que ilustran la expresión de encefalina tras la administración de cocaína aguda (Sal/Coc) y crónica (Coc/Coc). Barra de calibración = 1 mm. Los histogramas muestran la cuantificación de la expresión de encefalina en ratones  $D_2R^{+/+}$  y  $D_2R^{-/-}$  inducida por cocaína. En los ratones  $D_2R^{+/+}$ , la expresión de encefalina aumentó con el tratamiento agudo y crónico a nivel rostral (A) y con el tratamiento agudo a nivel medio (B) (#  $p < 0.01$ , &  $p < 0.05$  vs Sal/Sal). Sin embargo, en los ratones  $D_2R^{-/-}$ , no se observó aumento de encefalina con la administración de cocaína. En los ratones  $D_2R^{+/+}$  y  $D_2R^{-/-}$  tratados con salino, solamente se observó un aumento significativo de la expresión basal de encefalina en los ratones  $D_2R^{-/-}$  (\*  $p < 0.05$  (A, rostral), \*  $p < 0.01$  (B, media), \*\*  $p < 0.001$  (C, caudal) vs Sal/Sal  $D_2R^{+/+}$ ). ANOVA,  $n=6$ .

### 5.6. Fenotipo de neuronas estriatales que expresan c-Fos tras un tratamiento con cocaína.

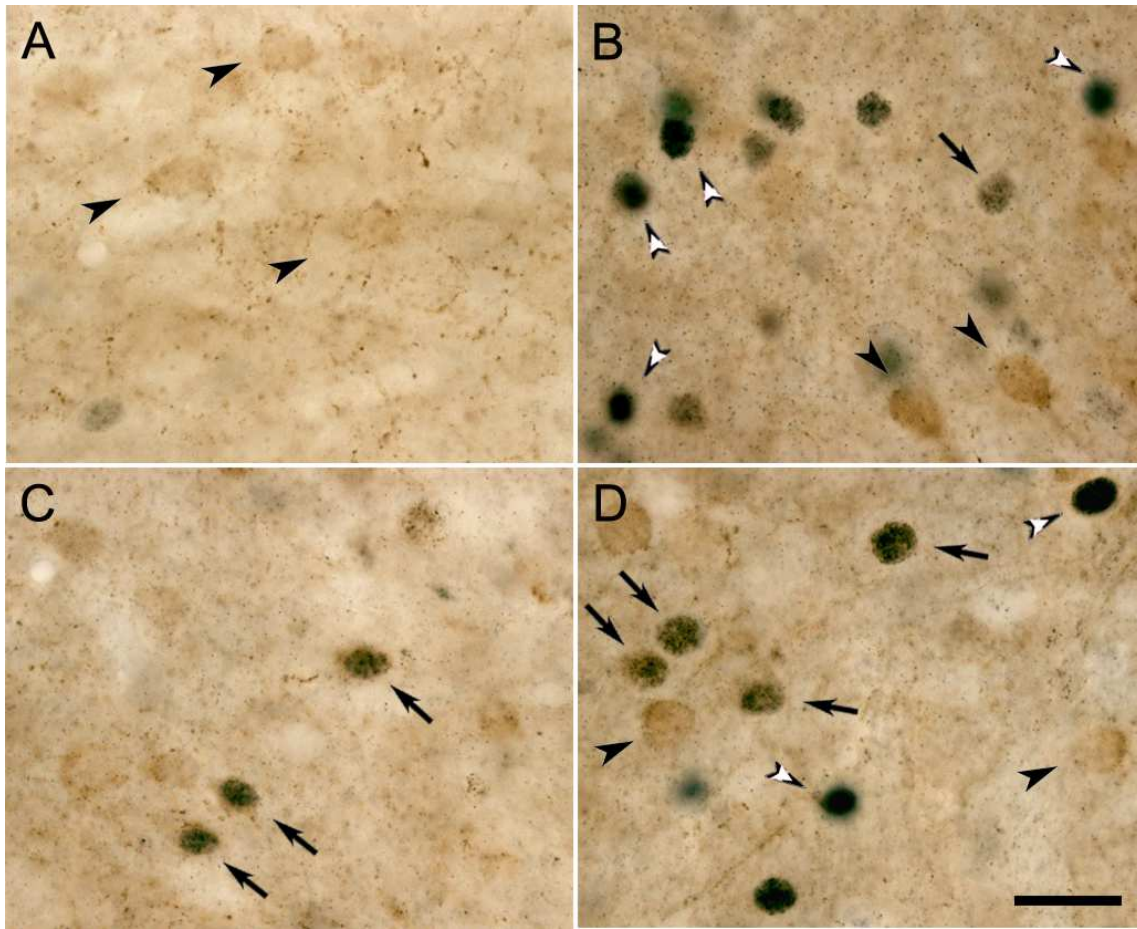
Experimentos anteriores demuestran que el tratamiento con cocaína induce la expresión de c-Fos en un grupo de neuronas estriatales del caudo-putamen y núcleo accumbens. Estas neuronas son aquellas que contienen el receptor dopaminérgico  $D_1$ , expresan el neuropéptido dinorfina y proyectan directamente a la sustancia negra. En las neuronas estriatales que expresan el neuropéptido encefalina y contienen receptores dopaminérgicos  $D_2$ , no se expresó c-Fos después de un tratamiento con cocaína (Berretta y cols., 1992; Gerfen y cols., 1995; Moratalla y cols., 1996a).

Se realizaron **estudios de inmunohistoquímica con doble marcaje** c-Fos/dinorfina y c-Fos/encefalina para determinar el fenotipo de las neuronas que expresan c-Fos basal, ya que los niveles basales de c-Fos están aumentados en  $D_2R^{-/-}$ . Además, se estudió el posible cambio del perfil fenotípico de las neuronas estriatales sensibles a la cocaína en ratones  $D_2R^{-/-}$ .

En condiciones basales, los ratones  $D_2R^{+/+}$  exhiben muy pocos núcleos c-Fos-positivos, que en ningún caso colocalizaron con encefalina (Fig 38A). Sin embargo, los ratones  $D_2R^{-/-}$  exhiben una expresión moderada de c-Fos, que se encuentran en su gran mayoría en neuronas encefalinérgicas (Fig 38C). En ningún caso se observó c-Fos en neuronas dinorfinérgicas en los ratones  $D_2R^{-/-}$  (Fig 37C). El tratamiento con cocaína, aguda o crónica, originó en los ratones  $D_2R^{+/+}$  una inducción de núcleos de c-Fos en neuronas dinorfinérgicas (Fig 37B) y raramente en las neuronas encefalinérgicas (figura 38B). Sin embargo, en ratones  $D_2R^{-/-}$  tratados con cocaína, se observaron núcleos c-Fos en neuronas dinorfinérgicas y también en encefalinérgicas (Figs 37D y 38D). Estos resultados indican que en condiciones basales, la inactivación del receptor de dopamina  $D_2$  aumenta la expresión de c-Fos en las neuronas de la vía indirecta o estriatopalidal. En estos ratones  $D_2R^{-/-}$  tratados con cocaína, existen dos tipos de poblaciones neuronales c-Fos-positivas, las encefalinérgicas que expresan c-Fos de manera constitutiva, y las dinorfinérgicas que expresan c-Fos inducido por cocaína.



**Figura 37 (A-D). El tratamiento con cocaína indujo la expresión de c-fos en neuronas dinorfina-positivas.** Inmunohistoquímica doble para detectar c-fos (núcleos en marrón) y dinorfina (citoplasma negruzco) en ratones  $D_2R^{+/+}$  (A, B) y  $D_2R^{-/-}$  (C, D), tratados con salino (A, C) o con cocaína (B, D). En condiciones basales, la inactivación del receptor  $D_2$  aumenta la expresión de c-Fos en neuronas dinorfina-negativas. La cocaína aumenta la expresión de c-Fos en neuronas dinorfina-positivas en ambos genotipos. Las puntas de flecha negras indican neuronas dinorfina+/Fos-; las blancas dinorfina-/Fos+ y las flechas largas dinorfina+/Fos+. Barra de calibración 20  $\mu$ m.



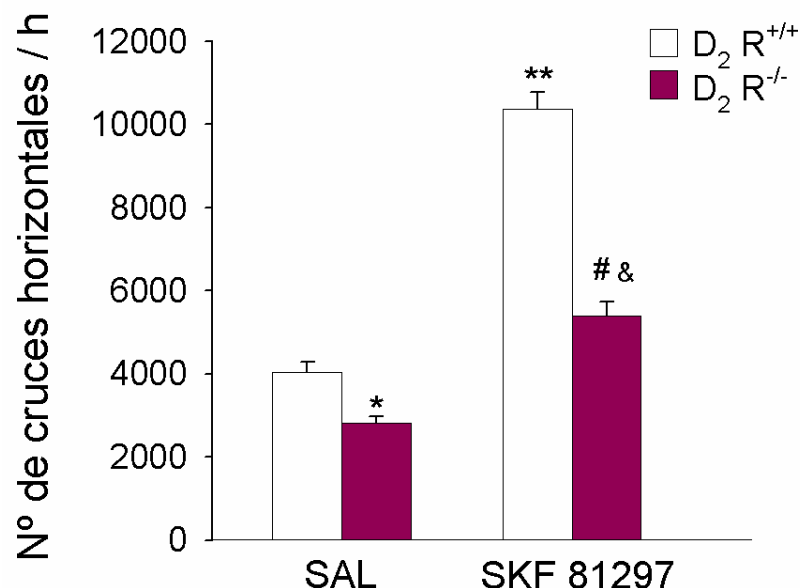
**Figura 38 (A-D). El tratamiento con cocaína indujo la expresión de c-fos en neuronas encefalina-positivas.** Inmunohistoquímica doble para detectar c-fos (núcleos negros) y encefalina (citoplasma marrón) en ratones  $D_2R^{+/+}$  (A, B) y  $D_2R^{-/-}$  (C, D), tratados con salino (A, C) o con cocaína (B, D). En condiciones basales, la inactivación del receptor  $D_2$  aumenta la expresión de c-Fos en neuronas encefalina-positivas. La cocaína induce expresión de c-Fos en neuronas encefalina-positivas en ratones  $D_2R^{-/-}$ . Las puntas de flecha negras indican neuronas encefalina+/Fos-; las blancas encefalina-/Fos+ y las flechas largas encefalina+/Fos+. Barra de calibración 20  $\mu$ m.

## 6. LA INACTIVACION DEL RECEPTOR D<sub>2</sub> DISMINUYE LOS EFECTOS DEL SKF 81 297, AGONISTA SELECTIVO DEL RECEPTOR D<sub>1</sub>,

Con el fin de determinar si los resultados obtenidos en el experimento anterior, con la administración de cocaína (agonista indirecto de receptores dopaminérgicos) son mediados por el receptor D<sub>2</sub> vía facilitación D<sub>1</sub>, se realizaron estudios de actividad locomotora e inmunohistoquímicos en ratones D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup> y D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> tratados con SKF 81297, agonista total selectivo del receptor dopaminérgico D<sub>1</sub>.

### 6.1. La inactivación del receptor D<sub>2</sub> disminuye la actividad locomotora inducida por SKF 81297.

Se estudió la actividad motora inducida por SKF 81297 (2.5 mg/kg, i.p.) en ambos genotipos de ratón, habituados durante 3 días consecutivos a las cajas de actividad y en el 4º día del experimento se llevó a cabo el tratamiento. La actividad locomotora se evaluó durante los 60 minutos posteriores a la inyección del compuesto. El SKF 81297 provocó un aumento de dicha actividad en ambos genotipos, aunque el aumento fue significativamente menor en ratones D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> (Fig 39).



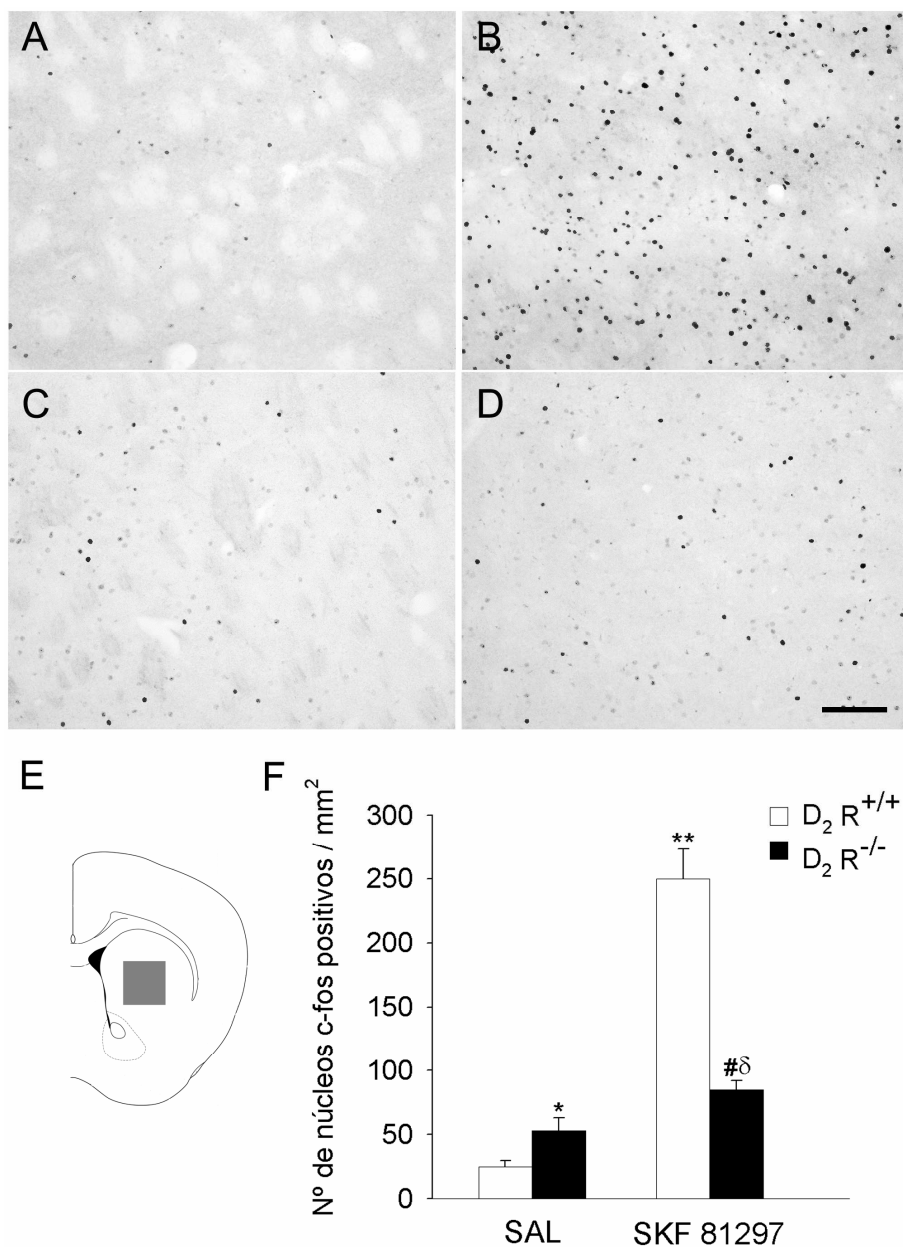
**Figura 39. La inactivación del receptor D<sub>2</sub> disminuye la actividad motora inducida por SKF 81297.** Los histogramas representan el número de cruces horizontales (media ± EEM) durante 60 min después del tratamiento con SKF 81297 o salino en ratones D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> y sus correspondientes wild-types. El SKF 81297 (2.5 mg/kg) aumentó la actividad locomotora en ambos genotipos de ratones, pero se observó una actividad locomotora menor con la inactivación del receptor. Diferencias significativas: \* p<0.05 y \*\* p<0.001 vs D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup> SAL; & p<0.001 vs D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> SAL; # p<0.001 vs D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup> SKF 81297, ANOVA, n=6-10.

Por consiguiente, observamos que es necesaria la presencia de los receptores  $D_2$  para que el receptor  $D_1$  pueda desarrollar plenamente sus acciones. Teniendo en cuenta que el SKF 81297 es un agonista selectivo del receptor  $D_1$ , los resultados obtenidos sugieren que las acciones de los receptores  $D_1$  vienen facilitadas por los receptores  $D_2$ .

## **6.2. La inactivación del receptor $D_2$ disminuye la expresión de c-Fos inducida por SKF 81297.**

En condiciones basales, se observó una mayor expresión de c-Fos en ratones  $D_2R^{-/-}$  que en los ratones  $D_2R^{+/+}$  como se recoge en el apartado 5.2 (Fig 29A, B). El tratamiento con SKF 81297, indujo un aumento de c-Fos en el estriado que fue significativamente mayor en ratones  $D_2R^{+/+}$  que en los  $D_2R^{-/-}$  (Fig 40B). Este aumento se distribuyó principalmente en las zonas dorsomedial y ventromedial y en menor medida en la zona lateral del estriado. En los ratones  $D_2R^{-/-}$ , la expresión de c-Fos inducida por el SKF 81297 se distribuyó homogéneamente por las distintas zonas del estriado (Fig 40D). La cuantificación de c-Fos demostró que la inactivación del receptor  $D_2$  incrementa al doble su expresión basal. El tratamiento con SKF 81297 aumentó aproximadamente 10 veces el número de núcleos de c-Fos en animales  $D_2R^{+/+}$ , mientras que en los  $D_2R^{-/-}$  fue sólo el doble con respecto a los salinos. Estos resultados demuestran que la inactivación del receptor  $D_2$  disminuye la expresión de c-Fos inducida por el SKF 81297 e indican que el  $D_2$  es necesario para que el receptor  $D_1$  desarrolle plenamente sus acciones, como ya se ha observado en el apartado anterior.





**Figura 40. La inactivación del receptor dopaminérgico  $D_2$  disminuye la expresión de c-fos inducida por SKF 81297.** A-D. Fotografías de secciones coronales de cerebro de ratón que ilustran la expresión de c-Fos tras la administración de salino (A, C) o SKF 81297 (B, D) en ratones  $D_2R^{+/+}$  (A, B) o  $D_2R^{-/-}$  (C, D). Barra de calibración = 100  $\mu$ m. E. Sección coronal de cerebro de ratón (Paxinos y Watson, 2005) que ilustra el área estriatal en gris, mostrada en las microfotografías. F. Los histogramas muestran la cuantificación de la expresión de c-Fos en ratones  $D_2R^{+/+}$  y  $D_2R^{-/-}$  inducida por SKF 81297. La inactivación del receptor  $D_2$  inhibió significativamente el aumento de c-Fos inducido por SKF 81297. Diferencias significativas: \*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.001$  vs  $D_2R^{+/+}$  SAL; &  $p < 0.05$  vs  $D_2R^{-/-}$  SAL; #  $p < 0.001$  vs  $D_2R^{+/+}$  SKF 81297. Test de Student,  $n=6$ .





## ***DISCUSIÓN***



El sistema dopaminérgico, a través de sus receptores más representativos, D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>, modula funcionalmente las acciones inducidas por agonistas cannabinoides y por psicoestimulantes. En la presente tesis doctoral, se aborda el esclarecimiento de la participación del sistema dopaminérgico en las acciones de los cannabinoides y los psicoestimulantes mediante el abordaje molecular, bioquímico, anatómico y comportamental. Hemos evaluado la distribución anatómica de los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> en comparación con la del receptor CB<sub>1</sub> en el estriado y la modulación de la expresión del receptor CB<sub>1</sub> por el sistema dopaminérgico. Además, utilizando ratones knock-out de los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>, se ha evaluado el impacto de la inactivación de estos receptores en la analgesia, hipotermia, actividad motora, efectos motivacionales y abstinencia del THC. Por otro lado, hemos evaluado la sensibilización motora (como medida indirecta de adicción) y la expresión de factores de transcripción y péptidos inducidas por los psicoestimulantes cocaína y anfetamina.

## **1. DETERMINACIÓN DEL SUSTRATO ANATÓMICO CELULAR DE LA INTERACCIÓN DEL SISTEMA DOPAMINÉRGICO CON EL SISTEMA CANNABINOIDE.**

### **1.1. Patrón de distribución y densidad del ARN mensajero del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> en los ganglios basales de rata.**

Los estudios simultáneos de localización del ARNm y la proteína para el receptor CB<sub>1</sub> y TH, nos permitieron establecer no sólo una independencia neuroanatómica sino también una gran proximidad en el trazado de los circuitos de los sistemas cannabinoide y dopaminérgico. Al igual que en estudios anteriores realizados por distintos autores (Mailleux y Vanderhaeghen, 1992; Marsicano y Lutz, 1999), observamos en la parte dorsolateral del estriado rostral y medio una expresión elevada del ARNm del receptor CB<sub>1</sub>, que va disminuyendo en áreas ventrales. Además, se constató otro gradiente de expresión dorsolateral, disminuyendo la expresión desde la región medial a la lateral, que presentó menor intensidad. También observamos algunas zonas de agregados celulares, que podrían corresponder a los estriosomas, donde la intensidad de señal es mayor que en la matriz estriatal.

Los estudios de anatomía comparada mediante experimentos de binding del receptor  $\mu$ -opioide, marcador de estriosomas, y de hibridación *in situ* para la localización del ARN mensajero del receptor CB<sub>1</sub>, mostraron la existencia de parches con mayor

intensidad de señal para el receptor CB<sub>1</sub> que coinciden con los estriosomes marcados con el receptor  $\mu$ . Estos resultados, apoyan trabajos anteriores que ponen de manifiesto la existencia de una interacción entre los sistemas cannabinoide y opioide en sistemas cerebrales motivacionales implicados en la dependencia a drogas (Navarro y cols., 2001). Estudios anatómicos previos han demostrado que existe una distribución similar de los receptores CB<sub>1</sub> y  $\mu$ -opioide en varias estructuras del SNC. Determinadas áreas cerebrales, como el caudado-putamen, el hipocampo dorsal y la sustancia negra, son ricas en estos receptores, siendo posible la colocalización de ambos tipos (Mansour y cols., 1988; Herkenham y cols., 1991; Mailleux and Vanderhaeghen, 1992; Rodríguez y cols., 2001). Los sistemas de señalización opioide y cannabinoide están implicados en la regulación de procesos fisiológicos comunes como nocicepción, comportamiento motor, inmunosupresión o recompensa (Manzanares y cols., 1999; Massi y cols., 2001; Corchero y cols., 2004; Manzanares y cols., 2006; Parolaro y cols., 2010). Además, la constancia de una interacción funcional entre ambos sistemas se apoya con análisis farmacológicos que confirman su cooperación en analgesia y en fenómenos de tolerancia-dependencia (Ledent y cols., 1999; Manzanares y cols., 1999; Martin y cols., 2000; Navarro y cols., 2001, Trigo y cols., 2010).

En el núcleo accumbens, la expresión del ARNm del receptor CB<sub>1</sub> fue menor que en el estriado. No detectándose mensajero ni en el GP ni en la SN. Estos resultados coinciden con trabajos previos, aunque están en desacuerdo con Matsuda y cols, (1993) que observaron células CB<sub>1</sub> positivas con un marcaje muy leve en la SN. En el presente estudio no se detectó ARNm del receptor CB<sub>1</sub> en SN, ni siquiera después de periodos de tiempo de exposición prolongados para aumentar la señal de hibridación.

Los resultados obtenidos con inmunohistoquímica muestran un patrón de distribución del receptor CB<sub>1</sub> similar al obtenido por autorradiografía, (Tsou y cols., 1998; Pettit y cols., 1998; Herkenham y cols., 1991a, b; Mailleux y Vanderhaeghen, 1992), ya que ambas técnicas identifican la localización de la proteína. Sin embargo, la distribución de ésta difiere claramente de la de su mensajero. Mediante inmunocitoquímica, en el estriado se observó un marcaje débil, con muy pocos cuerpos celulares. Sin embargo, en el GP y SN la inmunorreactividad para el receptor CB<sub>1</sub> fue muy intensa. Como el receptor CB<sub>1</sub> es un receptor de membrana, un marcaje citoplasmático uniforme podría representar la detección de una forma inactiva (recién

sintetizado o en estado de degradación). En el estriado, la baja inmunorreactividad para el CB<sub>1</sub> puede indicar que los receptores están localizados presinápticamente. Se han descrito algunos receptores CB<sub>1</sub> presinápticos en ciertas estructuras estriatales, como terminales aferentes de axones corticales (Gerdeman y Lovinger, 2001; Huang y cols., 2001), axones de interneuronas estriatales (Marsicano y Lutz, 1999; Hermann y cols., 2002) y axones recurrentes de neuronas de proyección (Szabo y cols., 1998).

Estudios realizados en colaboración con la Dra Julian en ratas tratadas con colchicina, que inhibe el transporte axonal, nos permitieron establecer una clara inmunorreactividad para el receptor CB<sub>1</sub> en los cuerpos celulares y dendritas de las neuronas del CPu. En el GP y SN no se observó inmunorreactividad en cuerpos neuronales, ni siquiera después del tratamiento con colchicina, lo que refuerza la hipótesis de que en estas áreas no se sintetiza el receptor CB<sub>1</sub>. Nuestros datos con hibridación *in situ* confirman que los receptores CB<sub>1</sub> se sintetizan en las neuronas estriatales para ser transportados a lo largo de las fibras de proyección eferentes, a través de las vías estriatonigral y estriatopalidal, localizándose finalmente en el terminal presináptico. Por tanto, la síntesis del mensajero del receptor CB<sub>1</sub> se realiza en las neuronas del estriado y la traducción de proteínas en áreas de proyección como el GP.

En los experimentos llevados a cabo no se detectó coexpresión o colocación de receptores CB<sub>1</sub> con estructuras TH-positivas en los ganglios basales. Además, se demostró que el receptor CB<sub>1</sub> no se sintetiza en neuronas dopaminérgicas de la SN, y que las fibras inmunorreactivas para CB<sub>1</sub> y TH están separadas en el Cpu, GP y SN. Por tanto, nuestros resultados no concuerdan con la hipótesis de la existencia de receptores CB<sub>1</sub> en las terminales dopaminérgicas del estriado, basada en los trabajos realizados por Ameri (1999). Asimismo, la existencia de coexpresión en las neuronas de proyección estriatal entre los receptores CB<sub>1</sub> y los receptores dopaminérgicos (Hermann y cols., 2002) hace posible la existencia de una relación funcional entre ambos receptores.

Estudios anteriores de microscopía electrónica, observaron la presencia de CB<sub>1</sub> en la membrana plasmática de cuerpos neuronales y dendritas en el CPu de rata, muy cerca de las uniones asimétricas de tipo excitatorio. En cambio, se observó una presencia escasa en terminales axónicas simétricas, y rara en las asimétricas (Rodríguez y cols., 2001). Estos resultados concuerdan con datos del grupo del Dr. Maldonado que indican

que el THC produce una activación de ERK en las neuronas estriatales (Valjent y cols., 2001). Esta activación se inhibió con la administración del antagonista selectivo del receptor CB<sub>1</sub>, SR 141716A y además resultó depender de la transmisión dopaminérgica, puesto que el bloqueo del receptor D<sub>1</sub> con SCH 23390, antes de la administración con THC, inhibió completamente la activación de ERK en el estriado. Por tanto, podemos concluir que la activación de los receptores CB<sub>1</sub> es dependiente de la transmisión dopaminérgica.

Estudios previos con raclopride, antagonista selectivo del receptor D<sub>2</sub>, indican que los receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> participan en menor grado en la activación de ERK (Valjent y cols., 2001). En rata se ha detectado una interacción entre el receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> y los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> en membranas de neuronas estriatales, a nivel de la transducción de señal de proteínas G/adenilato ciclase (Meschler y Howlett, 2001). Agonistas de los receptores CB<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> inhiben la adenilato ciclase activada por forskolina, mientras que los agonistas D<sub>1</sub> producen una estimulación de la adenilato ciclase que se inhibe con agonistas del receptor CB<sub>1</sub>. Sin embargo, la estimulación simultánea de los receptores CB<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> aumenta la actividad de la adenilato ciclase (Glass y Felder 1997). Por tanto, parece que hay una interacción funcional clara entre los receptores CB<sub>1</sub> y los dopaminérgicos y los resultados descritos proporcionan la base neuroanatómica que explica algunos de los mecanismos de interacción entre los sistemas cannabinoide y dopaminérgico.

## **1.2. Expresión del ARNm del receptor CB<sub>1</sub> en neuronas de proyección estriatales e interneuronas.**

Los estudios realizados en esta tesis doctoral prueban que el sistema cannabinoide endógeno es un importante modulador negativo de los comportamientos mediados por los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>, a través de sus acciones sobre las neuronas estriatales que expresan dichos receptores. Los datos obtenidos mediante estudios de hibridación *in situ* doble demuestran que los dos tipos de neuronas estriatales de proyección (estriatonigrales/SP+/D<sub>1</sub> y estriatopalidales/Enk+/D<sub>2</sub>), así como algunas interneuronas del estriado, expresan y sintetizan receptores CB<sub>1</sub>. Estos resultados confirman estudios previos en los que se establece una colocalización del receptor CB<sub>1</sub> con neuronas de proyección estriatal (Hermann y cols., 2002).

El ARNm del receptor CB<sub>1</sub> se expresa mayoritariamente en las neuronas de proyección. Estudios cuantitativos que evalúan los granos de plata correspondientes a CB<sub>1</sub> en ambos tipos de neuronas, demuestran que aproximadamente el 40% de las neuronas estriatales que expresan CB<sub>1</sub> son neuronas de la vía indirecta, que también expresan receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> y Enk, mientras que el 60% restante son neuronas de la vía directa que contienen el receptor D<sub>1</sub> y SP. Este patrón de colocalización sugiere que los dos tipos de neuronas de proyección constituyen el sustrato anatómico para la modulación cannabinoide de las funciones de los ganglios basales. Como además colocaliza con los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> es posible que la estimulación de receptores dopaminérgicos module la función de los receptores CB<sub>1</sub> en dichas neuronas.

Por otro lado, nuestros estudios demuestran que los receptores CB<sub>1</sub> se expresan también en interneuronas PVB y GAD<sub>67</sub> que se encuentran cerca de la corteza cerebral. Se ha constatado que los receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> controlan la excitabilidad de las neuronas estriatales en respuesta a la activación cortical. Estudios anteriores indican que una estimulación química de la corteza activa a las interneuronas, induciendo la expresión de c-Fos (Berretta y cols., 1999). Las interneuronas estriatales que expresan PVB y GAD<sub>67</sub>, expresan también receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> (Rivera y cols., 2002a) pero no receptores D<sub>1</sub>, sugiriendo que, en la corteza, la interacción entre los sistemas endocannabinoide y dopaminérgico podría tener lugar a través de interneuronas estriatales que expresan el receptor dopaminérgico D<sub>2</sub>. Por otro lado, las interneuronas que expresan PVB también expresan receptores dopaminérgicos D<sub>5</sub> (Rivera y cols., 2002b), que son muy similares a los receptores D<sub>1</sub> en su estructura, farmacología y son activados por ligandos del receptor D<sub>1</sub>.

## **2. LA INACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS D<sub>1</sub> Y D<sub>2</sub> NO MODIFICA LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR CB<sub>1</sub>.**

Con el fin de establecer si existe una modulación de la expresión del receptor CB<sub>1</sub> por el sistema dopaminérgico a través sus dos receptores más representativos, D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>, se realizaron estudios que demostraron que el patrón anatómico de expresión del ARN mensajero del receptor CB<sub>1</sub> en ratón ( Marsicano y Lutz, 1999, Hermann y cols, 2002) es muy semejante al patrón descrito en rata (Herkenhan y cols, 1991a; Herkenhan



y cols, 1991b; Mailleux y Vanderhaeghen, 1992; Matsuda y cols, 1993). El mensajero del receptor CB<sub>1</sub> presenta un patrón de distribución similar en rata y en ratón. Así, el estriado y el cerebelo presentan mayor expresión del receptor CB<sub>1</sub> que la corteza y el hipocampo. De las estructuras estudiadas, el núcleo accumbens fue la que presentó menor número de transcritos.

La inactivación del receptor D<sub>1</sub> o D<sub>2</sub> no alteró ni el patrón de distribución, ni los niveles de expresión del receptor CB<sub>1</sub>. Por tanto, nuestros resultados demostraron que la inactivación de uno de los receptores dopaminérgicos no afecta la expresión del mensajero del receptor CB<sub>1</sub>, a pesar de que se co-exprese con los dos receptores.

### **3. PAPEL FUNCIONAL DEL SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO EN RESPUESTAS CONDUCTUALES MEDIADAS POR LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS D<sub>1</sub> Y D<sub>2</sub>.**

La colocación de receptores CB<sub>1</sub> con los receptores dopaminérgicos, D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>, indica que todos estos receptores pueden interactuar modificando potencialmente sus respectivas funciones, con importantes consecuencias conductuales y farmacológicas. Apoyando esta hipótesis, existen varios estudios bioquímicos y moleculares que sugieren la interacción entre los receptores CB<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> a nivel celular (Glass y Felder, 1997; Kearn y cols., 2005). Los cannabinoides exógenos causan un efecto inhibitorio general sobre los comportamientos mediados por dopamina (Rodríguez de Fonseca y cols., 1998). Además, la activación del receptor CB<sub>1</sub> en el estriado está asociada a una inhibición general del comportamiento motor, causando cambios a largo plazo en la plasticidad sináptica estriatal (Ronesi y cols., 2004). Investigaciones anteriores han demostrado que los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> son determinantes para el control estriatal de la función motora. Las neuronas que expresan receptores D<sub>1</sub> forman parte de la vía directa, que proyecta al globo pálido interno y a la sustancia negra, mientras que las neuronas que expresan receptores D<sub>2</sub> constituyen la vía indirecta, que proyecta al globo pálido externo (McKenzie y cols., 1984; Paul y cols., 1992; O'Connor, 1998; Incola y cols., 2000; Svenningsson y cols., 2000; Onn y cols., 2000). La dopamina actúa como modulador relevante de las aferencias corticoestriatales excitatorias facilitando el comportamiento motor (inicio, secuenciación y finalización del movimiento, Hauber, 1998). Además existen varios comportamientos inducidos por la estimulación específica de los receptores D<sub>1</sub> o D<sub>2</sub>, susceptibles de ser utilizados para la evaluación funcional de las diferentes vías estriatofugales (Aldridge y Berridge, 1998) y

su modulación por el sistema endocannabinoide. En roedores, la estimulación de los receptores D<sub>1</sub> provoca comportamientos motores como el grooming o acicalamiento mientras que la estimulación de los receptores D<sub>2</sub> aumenta la actividad locomotora horizontal y da lugar a movimientos orales estereotipados. En este estudio seleccionamos el comportamiento de grooming y estereotipias orales, como indicadores funcionales de los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>, respectivamente (Giuffrida y cols., 1999; Molloy y Waddington, 1984; Starr y Starr, 1986a, b).

Varios estudios ponen de manifiesto que, en los ganglios basales, el sistema cannabinoide endógeno juega un papel clave en el ajuste de la transmisión sináptica dentro de las sinapsis estriatales. Esto puede ocurrir, actuando como un mensajero retrógrado sobre las entradas glutamatérgicas o gabaérgicas, o bien modulando directamente, a nivel postsináptico, la transducción de señal en los receptores dopaminérgicos (Glass y Felder, 1997; Mato y cols., 2004; Rodríguez de Fonseca y cols., 1998). En relación a esto, está demostrado que la administración de agonistas CB<sub>1</sub> en condiciones basales induce *down regulation* de receptores dopaminérgicos estriatales, tanto D<sub>1</sub> como D<sub>2</sub>. Apoyando esta hipótesis, la estimulación farmacológica de ambos tipos de receptores, D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>, parece aumentar la producción de anandamida en los ganglios basales, actuando, por tanto, como un mecanismo de *feedback* inhibitorio que contrarresta la facilitación inducida por la dopamina en la actividad motora (Ferrer y cols., 2003, Giuffrida y cols., 1999). De hecho, es conocida que la administración de quinpirole, agonista D<sub>2</sub>, estimula la liberación de anandamida. Este papel inhibitorio sobre la transmisión sináptica, se refleja en la inhibición inducida por el receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> en los comportamientos mediados por los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> (Rodríguez de Fonseca y cols., 1994b). Los datos obtenidos en nuestros estudios confirman esta interacción negativa sobre varias respuestas conductuales.

Para investigar los efectos de los cannabinoides endógenos (anandamida y 2-araquidonilglicerol) utilizamos AM 404, que aumenta los niveles de anandamida extracelulares ya que bloquea su recaptación celular y potencia sus efectos (Beltramo y cols., 1997 y 2000; Bisogno y cols., 2001). Nuestros estudios demuestran que la activación indirecta de los receptores CB<sub>1</sub> por AM 404 inhibe el comportamiento de grooming, respuesta mediada por el receptor D<sub>1</sub>, sugiriendo que los cannabinoides endógenos, vía CB<sub>1</sub>, dan lugar a una regulación negativa de las respuestas mediadas por

dicho receptor. Además, nuestros datos revelan que el receptor D<sub>2</sub> también parece influir en el comportamiento de grooming, ya que el quinpirol, agonista D<sub>2</sub>, redujo dicho comportamiento indicando en él una modulación opuesta de los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>, como había sido ya demostrado en estudios previos (Starr y Starr, 1986a, b). La modulación de los niveles de endocannabinoides por AM 404 no influyó en la actividad inhibitoria de quinpirol en grooming, posiblemente debido a que con quinpirol ya se ha alcanzado el efecto más bajo. Sin embargo, la administración de SR 141716A revierte la supresión del grooming inducido por la administración combinada de quinpirol y AM 404, indicando una clara interacción entre los receptores CB<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> que se oponen mutuamente a la facilitación mediada por el receptor D<sub>1</sub> en el grooming.

En roedores, los movimientos orales estereotipados son una respuesta característica al estímulo de los receptores D<sub>2</sub> y parecen estar modulados a nivel estriatal (McPherson y Marshall, 1996; Davidkova y cols., 1998). Confirmando resultados previos, nuestros datos indican que la estimulación de receptores D<sub>1</sub> no afecta a las respuestas orales, mientras que los agonistas D<sub>2</sub> dieron lugar, en ratas, a estereotipias orales que disminuyeron con la estimulación del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>. Estos resultados ponen de manifiesto que en el estriado tiene lugar una interacción negativa entre los receptores CB<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> con respecto a las estereotipias orales, como ha sido descrito previamente para la actividad locomotora horizontal (Giuffrida y cols., 1999). Existen importantes implicaciones terapéuticas, ya que en humanos las estereotipias orales son un efecto secundario a la manipulación dopaminérgica prolongada, como es el caso del tratamiento con neurolépticos para la psicosis y la terapia con L-dopa en la enfermedad de Parkinson. Nuestros resultados sugieren que los agonistas CB<sub>1</sub> pueden tener potencial terapéutico para reducir la incidencia de estas respuestas orales anormales. En este contexto, hay datos fehacientes que indican que las drogas que aumentan la actividad del sistema endocannabinoide pueden tener la capacidad de eliminar o prevenir las disquinesias no deseadas en pacientes parkinsonianos (Ferrer y cols., 2003), sin afectar a los efectos beneficiosos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> de la L-dopa. En la enfermedad de Parkinson, el sistema cannabinoide endógeno se encuentra hiperactivado; de ahí el poco o nulo éxito de agonistas cannabinoides como terapia antiparkinsoniana. Pero los antagonistas han mostrado eficacia, mejorando los síntomas motores en fases avanzadas de la enfermedad (El-Banoua y cols., 2004; Fernández-Espejo y cols., 2005)

Hay que tener en cuenta que existen otras dianas de anandamida y AM 404, como el receptor vanilloide TRPV<sub>1</sub>, que contribuyen potencialmente a la inhibición de comportamientos mediados por dopamina (De Lago y cols., 2004; Tzavara y cols., 2006). Sin embargo, nuestros datos confirman farmacológicamente la participación del receptor CB<sub>1</sub> en la acción del AM 404 sobre comportamientos mediados por dopamina. La administración del agonista cannabinoide, HU-210, suprimió tanto el grooming mediado por el receptor D<sub>1</sub> como las estereotipias orales mediadas por el receptor D<sub>2</sub>. Además, las acciones inhibitorias del AM 404 y HU-210 se revirtieron con la administración del antagonista del receptor CB<sub>1</sub>, SR 141716A. La administración de AM 404 es capaz de inhibir la hiperactividad glutamatérgica cortical (provocada con un modelo de 6-OHDA en rata), mejorando la acinesia y la sintomatología motora (Fernández-Espejo y cols., 2004). Así, aunque la activación de receptores vanilloides pueda ejercer acciones antidopaminérgicas, nuestros resultados confirman que los efectos observados en los estudios que hemos realizado están mediados por los receptores CB<sub>1</sub>.

Desde un punto de vista funcional, los efectos de la estimulación de los receptores D<sub>1</sub> podrían asemejarse a los efectos fisiológicos de la dopamina en cuanto que originan una excitación neta de las neuronas de la corteza motora (Löschmann y cols., 1997; Onn y cols., 2000). En el estriado, como se ha descrito anteriormente, los agonistas del receptor D<sub>1</sub> estimulan la función motora; en concreto, la administración intraestriatal de SKF 38393 induce un aumento del movimiento en la rata (You y cols., 1994). Nuestros resultados revelaron que la activación local intraestriatal del receptor D<sub>1</sub> (pero no del D<sub>2</sub>), aumentó la función motora dando lugar a rotaciones contralaterales. Además, pusieron de manifiesto que la manipulación de los receptores CB<sub>1</sub> con ligandos cannabinoides modificó las respuestas motoras inducidas por D<sub>1</sub>: el bloqueo del CB<sub>1</sub> las aumentó y la activación del CB<sub>1</sub> las bloqueó, de forma que, de nuevo, concluiríamos en una interacción negativa entre los receptores CB<sub>1</sub> y D<sub>1</sub>. Aunque el AM 404 también puede activar los receptores vanilloides TRPV<sub>1</sub> (Zygmunt y cols., 2000), los efectos mediados por AM 404 sobre la rotación inducida por SKF se bloquearon por SR 141716A, lo que indica que el efecto de AM 404 es mediado por los receptores CB<sub>1</sub>. Como se ha descrito previamente, la estimulación D<sub>2</sub> con quinpirol o bromocriptina no produjo ningún efecto sobre el comportamiento de rotación (Sañudo-Peña y cols., 1998a). Muchos estudios han demostrado que la activación del receptor D<sub>2</sub> sólo

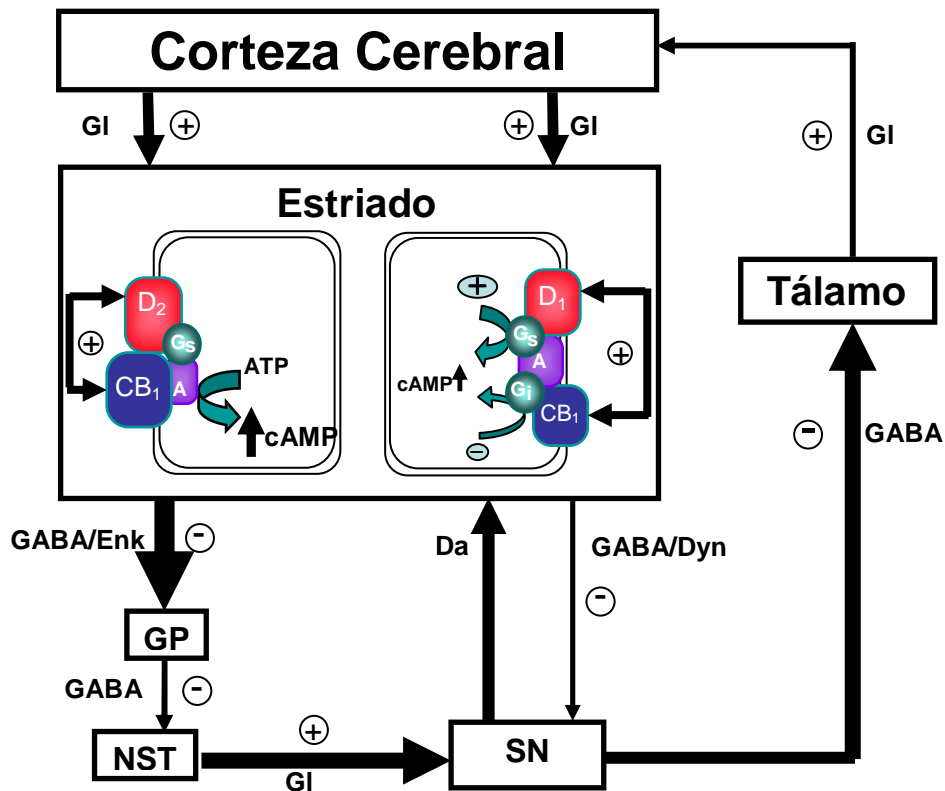
modifica las respuestas de rotación en ratas con una innervación estriatal unilateral, y esto probablemente se debe a que existe una sobreexpresión compensatoria de receptores  $D_2$  (El Banoua y cols., 2004). Cabe señalar, a modo de resumen, que la infusión intraestriatal de antagonistas del receptor  $CB_1$  causó activación motora, mientras que los agonistas del receptor  $CB_1$  inhibieron dicha actividad.

Con el fin de analizar esta relación, realizamos experimentos con ratones carentes del receptor dopaminérgico  $D_1$  ( $D_1R^{-/-}$ ). En ratones, el grooming es un comportamiento característico asociado con una estimulación selectiva de los receptores  $D_1$  (Starr y Starr, 1986a, b). Nuestras conclusiones confirmaron que esta respuesta se activa después de la estimulación del receptor  $D_1$ , aunque desaparece en ratones que carecen de dicho receptor. Además, en los ratones  $D_1R^{-/-}$  no se observó grooming al administrar antagonistas del receptor  $CB_1$ , lo que confirma que este efecto está mediado por receptores  $D_1$ . Por otro lado, el comportamiento de grooming se activa después de la estimulación del  $D_1$  o por bloqueo del receptor  $CB_1$ , indicando que estos receptores tienen efectos contrapuestos sobre dicho comportamiento. En ratones  $D_1R^{-/-}$  no se observó un aumento del grooming después del bloqueo del  $CB_1$ , lo que parece indicar que los efectos inducidos por el bloqueo de este receptor en ratones  $D_1R^{+/+}$  se deben a un tono basal cannabinoide que inhibe el comportamiento mediado por los receptores  $D_1$ . En los experimentos que hemos realizado, los ratones  $D_1R^{+/+}$  tratados con AM 404 presentaron más grooming que los ratones  $D_1R^{+/+}$  tratados con el vehículo, aunque la respuesta fue cuatro veces menor que la observada después del estímulo del receptor  $D_1$ . Además, el pretratamiento con AM 404 suprimió completamente la elevada respuesta inducida por agonistas dopaminérgicos. En los ratones  $D_1R^{-/-}$  no se observó ninguno de los efectos producidos por SKF 81297, lo que sugiere una dependencia crítica del receptor  $D_1$ . Después de la administración de AM 404 se constató un pequeño aumento del comportamiento de grooming, tanto en ratones  $D_1R^{+/+}$  como en ratones  $D_1R^{-/-}$ , que puede estar relacionado con dianas alternativas implicadas en grooming localizadas en otros lugares; por ejemplo, una respuesta de estrés provocada por la inyección de AM 404, ya que el estrés induce grooming en ratones (Kalueff y Tuohimaa, 2005).

Como conclusión general, podemos decir que nuestros estudios demuestran que el ARNm del receptor  $CB_1$  colocaliza con receptores dopaminérgicos  $D_1$ , en las neuronas estriatales de proyección de la vía directa, y con receptores  $D_2$ , en neuronas de

proyección que forman parte de la vía indirecta. Esto permite a los cannabinoides endógenos actuar sobre los receptores CB<sub>1</sub>, para modular no sólo las entradas aferentes glutamatérgicas en el estriado sino también las salidas eferentes inhibitorias de las neuronas estriatales hacia sus campos de proyección en el mesencéfalo. Así se muestra en el diagrama del circuito de motor de los ganglios basales (fig 41).

Estos datos apoyan la hipótesis de que, en el estriado, los cannabinoides endógenos actúan a través de los receptores CB<sub>1</sub> inhibiendo los comportamientos motores mediados por dopamina, entre los que se incluyen el comportamiento de grooming, mediado por el receptor D<sub>1</sub>, las rotaciones inducidas por el receptor D<sub>1</sub>, así como las estereotipias orales causadas por el receptor D<sub>2</sub>. Estudios previos han descrito que los agonistas CB<sub>1</sub> facilitan la actividad dopaminérgica en el núcleo accumbens (French y cols., 1997). Aunque esta afirmación parece contradecir nuestras conclusiones, es en realidad compatible con nuestros resultados debido a la complejidad del circuito de los ganglios basales mostrado en la figura 41. La interacción entre los receptores CB<sub>1</sub> y D<sub>1</sub> en el estriado dorsal, disminuyó las entradas inhibitorias de las neuronas de proyección estriatal sobre las neuronas dopaminérgicas en el área tegmental ventral y SN que proyectan al núcleo accumbens y al estriado, aumentando su actividad.



**Figura 41. Diagrama del circuito motor de los ganglios basales.** Este diagrama simplificado muestra las principales conexiones entre regiones del circuito motor de los ganglios basales. Los receptores cannabinoides **CB<sub>1</sub>** se co-expresan con receptores **D<sub>1</sub>** en las neuronas de la vía directa y con los receptores **D<sub>2</sub>** en las de la vía indirecta. La localización de los receptores **CB<sub>1</sub>** permite a los cannabinoides modular las entradas glutamatérgicas aferentes al estriado y las salidas inhibitorias eferentes de las neuronas de proyección estriatales. **GP**; Globo Pálido; **NST**; Núcleo Subtalámico; **SN**; Sustancia negra.

Las interacciones funcionales entre los receptores dopaminérgicos **D<sub>1</sub>** y **D<sub>2</sub>** y el receptor cannabinoide **CB<sub>1</sub>** podrían deberse a una interacción directa receptor-receptor, (Kearn y cols., 2005) o a través de los efectos de estos receptores sobre neuronas en diferentes regiones del circuito motor. Otra de las posibilidades, es a través de la activación de sus vías de señalización intracelular (Glass y Felder, 1999). Así, los receptores dopaminérgicos **D<sub>1</sub>** y **D<sub>2</sub>** y el receptor **CB<sub>1</sub>** regulan la adenilato ciclasa, y esta vía común puede ser una buena diana para la interacción. La activación simultánea de los receptores **CB<sub>1</sub>** y **D<sub>1</sub>** causa una disminución neta de la adenilato ciclasa, provocando una disminución de la actividad inhibitoria de las neuronas estriatales sobre las neuronas de la **SN**, que aumenta la actividad inhibitoria de la **SN**, que conlleva a un aumento de la inhibición del tálamo y por tanto a un descenso en la respuesta motora (Fig 41). Por el contrario, la activación simultánea de los receptores **CB<sub>1</sub>** y **D<sub>2</sub>** estimula la adenilato

ciclasa (Glass y Felder, 1997), activando las neuronas de la vía indirecta, lo que a su vez activa las neuronas de los núcleos subtalámicos, y provoca en última instancia una inhibición del movimiento. Aunque esta perspectiva esté de acuerdo con nuestros resultados, es necesario realizar nuevos trabajos para determinar si el efecto de activación del receptor CB<sub>1</sub> sobre los comportamientos mediados por D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> es un hecho mediado a través de la vía de señalización de la adenilato ciclasa. Independientemente del mecanismo, nuestros resultados indican que los cannabinoides endógenos, actuando a través del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> estriatal, juegan un importante papel en la regulación del circuito motor de los ganglios basales.

#### **4. PAPEL COMPORTAMENTAL DE LOS RECEPTORES D<sub>1</sub> Y D<sub>2</sub> EN LAS ACCIONES MEDIADAS POR LOS CANNABINOIDES.**

En el presente trabajo de investigación hemos evaluado el papel de los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> en las respuestas motivacionales y fisiológicas inducidas por THC, utilizando para ello ratones deficientes en estos receptores. También fue objetivo de este trabajo la investigación de la participación del receptor dopaminérgico D<sub>2</sub> en la dependencia física producida por THC.

##### **4.1. Implicación de los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> en los efectos motores del THC.**

Uno de los propósitos de este estudio fue la evaluación de la actividad locomotora y el desarrollo y mantenimiento de la sensibilización a las respuestas locomotoras después de un tratamiento crónico con THC.

El tratamiento agudo con THC disminuyó la actividad locomotora espontánea en todos los grupos experimentales (Zimmer y cols, 2001, Monory y cols., 2007). En consecuencia, los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> no son esenciales para la respuesta aguda del THC. Estudios anteriores demuestran que el sistema endocannabinoide está implicado en el control de la actividad locomotora, al tener un importante papel a nivel de los ganglios basales (Romero y cols., 1995; Sañudo-Peña y Walkers, 1998; Sañudo-Peña y cols., 1999). Diversas investigaciones relacionan los efectos que producen los cannabinoides sobre el control de la actividad locomotora con la gran abundancia de receptores CB<sub>1</sub> presentes en la zona de los ganglios basales y el cerebelo (Herkenham y



cols., 1990; Matsuda y cols., 1993; Mailleux y Vanderhaeghen, 1992; Tsou y cols., 1998). Los cannabinoides activan los receptores CB<sub>1</sub>, dando lugar a una disminución de la actividad motora espontánea, e incluso pueden llegar a producir catalepsia (Romero y cols., 1995; Gonzalez y cols., 1999; van der Stelt y Di Marzo, 2003). Además modulan la actividad de tres importantes neurotransmisores implicados en la funcionalidad de los ganglios basales, como son dopamina, GABA y glutamato.

Los estudios llevados a cabo evaluaron las respuestas locomotoras y el desarrollo de tolerancia después de un tratamiento crónico con THC. Los resultados obtenidos en ratones D<sub>1</sub> demuestran que el tratamiento crónico ip con THC origina una disminución de la actividad locomotora, que se mantiene durante todo el tratamiento tanto en ratones D<sub>1</sub>R<sup>+/+</sup> como en D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>. Solamente se observó una leve tolerancia al final del tratamiento en los ratones D<sub>1</sub>R<sup>+/+</sup>. Por tanto, estos resultados demuestran que el receptor dopaminérgico D<sub>1</sub> no está implicado en los efectos motores crónicos del THC. En experimentos anteriores, con ratones deficientes en dinorfina, se ha demostrado que dicho péptido no está implicado en las respuestas motoras al THC (Zimmer y cols., 2001), por lo que podemos establecer una relación con los receptores D<sub>1</sub> ya que se expresan en las mismas neuronas estriatales que expresan dinorfina. Sin embargo, la administración crónica icv dio lugar a un fenómeno de tolerancia en los ratones D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>, indicando que en este caso es necesaria la integridad del receptor para que se mantenga el descenso de la actividad locomotora. La diferencia de efectos en los distintos tratamientos puede ser debido a que la administración icv es local (2 veces al día) y la administración ip es sistémica (1 vez al día). De hecho en la bibliografía abundan los datos contradictorios referentes a diferentes efectos inducidos por un mismo cannabinoide según su lugar de administración. Por ejemplo, la infusión de agonistas cannabinoides en la sustancia negra de animales intactos induce rotación contralateral, mientras que en el globo pálido o en el estriado induce rotación ipsilateral (Sañudo-Peña y cols., 1996; Fernández-Espejo y cols., 2004).

En los ratones D<sub>2</sub>, la administración crónica de THC disminuyó la actividad locomotora durante el tratamiento, tanto en ratones D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup> como en ratones D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>, siendo mayor esa disminución en ratones D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup>. En ratones D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup>, se observó el desarrollo de tolerancia, ya que se observó una disminución progresiva de la inhibición del movimiento tras la administración de THC. En los ratones D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>, la disminución de la actividad locomotora se mantuvo durante el tratamiento y sólo se observó tolerancia al

efecto en la administración icv. Por consiguiente, nuestros resultados demuestran que el receptor dopaminérgico D<sub>2</sub> está implicado en la respuesta motora del THC y en el desarrollo de tolerancia. Estos resultados concuerdan con otros estudios de tolerancia realizados en ratones knock-out para encefalina (Valverde y cols., 2000), donde demostraron que la falta de encefalina disminuye la tolerancia a los efectos motores del THC. Los receptores D<sub>2</sub> se expresan en neuronas encefalinérgicas estriatales, estos resultados sugieren que la inactivación de una de las dos proteínas en la misma neurona, tiene efectos similares.

Investigaciones anteriores establecieron que el tratamiento crónico con agonistas cannabinoides desarrolla tolerancia a los efectos característicos de los cannabinoides (Abood y Martin, 1992; Fan y cols., 1996; Hutcheson y cols., 1998; Bass y Martin, 2000; Castañe y cols., 2003; Rubino y cols., 2004). En el desarrollo de esa tolerancia participan, principalmente, mecanismos moleculares que afectan la expresión de receptores CB<sub>1</sub>. La exposición crónica a cannabinoides disminuyó el número total de receptores cannabinoides CB<sub>1</sub> y los niveles de ARNm de dicho receptor en distintas estructuras cerebrales, concretamente en áreas de los ganglios basales relacionadas con el control motor como el estriado (Rodríguez de Fonseca y cols., 1994a; Rubino y cols., 1994, 2000; Zhuang y cols., 1998). Además, la administración crónica dio lugar a cambios en la expresión de las proteínas G asociadas al receptor, que están relacionados con el fenómeno de desensibilización de los receptores (Sim y cols., 1996).

Por tanto, el tratamiento con agonistas cannabinoides afectaría a la modulación del sistema cannabinoide endógeno sobre el control y regulación de las conductas motoras. Nuestros resultados demuestran que solamente el receptor D<sub>2</sub> estaría implicado en las respuestas de tolerancia inducida por un tratamiento crónico con THC, y que el receptor D<sub>1</sub> no parece estar implicado en el desarrollo de tolerancia.

#### **4.2. Implicación de los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> en el efecto hipotérmico y analgésico inducido por THC.**

Como está ampliamente descrito, la administración de agonistas cannabinoides induce numerosos efectos fisiológicos como analgesia, hipoactividad, hipotensión e hipotermia (Pertwee, 1997 y 2001; Malone y Taylor, 1998; Ameri, 1999; Varvel y cols., 2005; Smirnov y Kiyatkin, 2008). Los estudios realizados sobre el efecto analgésico y el descenso de temperatura inducido por THC en ratones D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>, demuestran que ambos

tipos de ratones presentan un efecto analgésico e hipotérmico semejante. Los dos grupos experimentales desarrollaron tolerancia a ambos efectos, apareciendo antes en los ratones  $D_2$  que en los  $D_1$ . Trabajos anteriores proponen que la transmisión dopaminérgica está implicada en la regulación de la temperatura corporal (Salmi, 1998; Canini y Bourdon, 1998) y en la regulación de los efectos hipotérmicos inducidos por THC (Nava y cols., 2000). Otras investigaciones demuestran que es posible que la presencia del receptor  $CB_1$  en las neuronas que expresan receptor  $D_1$  contribuya a la hipotermia inducida por THC (Monory y cols, 2007).

En el presente estudio demostramos que el efecto analgésico agudo y crónico, inducido por THC, disminuyó en los ratones  $D_1R^{-/-}$  pero no se desarrolló tolerancia a los efectos. En ratones  $D_2R^{+/+}$  y  $D_2R^{-/-}$ , el efecto analgésico y el descenso de temperatura, tras un tratamiento agudo y crónico con THC, fue semejante.

Por tanto, los resultados obtenidos demuestran que el receptor  $D_1$  está implicado en el efecto analgésico y en el descenso de temperatura, pero no en el desarrollo de tolerancia inducido por la administración crónica de THC. Por su parte, el receptor  $D_2$  no está implicado en el efecto analgésico ni en el descenso de temperatura, ni tampoco en el desarrollo de tolerancia inducido por THC. Estudios anteriores realizados en rata con antagonistas del receptor  $D_2$ , demuestran que el efecto analgésico y el descenso de temperatura resultan disminuidos por tales antagonistas (Carta y cols., 1999; Nava y cols., 2000). Otros estudios realizados en rata con antagonistas del receptor  $D_1$ , demostraron que la hipotermia inducida por el THC no se modifica con dichos antagonistas (Nava y cols., 2000).

#### **4.3. El receptor dopaminérgico $D_2$ no está implicado en los efectos motivacionales inducidos por THC.**

Los receptores dopaminérgicos  $D_2$  tienen gran relevancia en los efectos reforzadores de las drogas de abuso. En los experimentos realizados evaluamos la implicación de dichos receptores en los efectos motivacionales inducidos por la administración de THC.

La evaluación se realizó sobre el modelo de preferencia espacial condicionada en función de las dosis empleadas. Estudios previos demuestran que dosis bajas de THC no son efectivas para inducir preferencia espacial (Parker y Gillies, 1995; Mallet y Beninger, 1998; Robinson y cols., 2003). En contraposición, dosis elevadas de THC producen aversión espacial en rata y en ratón (Sañudo-Peña y cols., 1997; Hutcheson y

cols., 1998; Cheer y cols., 2000). Se ha demostrado, asimismo, que los efectos aversivos producidos por el THC se bloquearon con el antagonista del receptor CB<sub>1</sub>, SR 141716A (Chaperon y cols, 1998), sugiriendo que estos efectos están mediados por el receptor CB<sub>1</sub>. Existen otros trabajos en los que, utilizando dosis bajas de THC, se produce preferencia espacial en ratones previamente expuestos a THC (Valjent y Maldonado, 2000a; Valjent y cols, 2002).

Estudios bioquímicos realizados han demostrado que el THC produce, al igual que otras drogas de abuso, cambios neuroquímicos en el sistema dopaminérgico mesolímbico que podrían dar lugar a un posible efecto de recompensa (French y cols., 1997; Tanda y cols., 1997). Por tanto, estudiamos si los receptores dopaminérgicos estaban involucrados en la adicción a THC. Siguiendo el modelo descrito de condicionamiento espacial al THC (aversión o preferencia) en ratones D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup> y D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>, no observamos diferencias significativas entre los genotipos, en ninguna de las situaciones. Estos resultados indican que el receptor dopaminérgico D<sub>2</sub> no participa en los efectos motivacionales inducidos por THC evaluados en este modelo.

#### **4.4. La inactivación del receptor dopaminérgico D<sub>2</sub> disminuyó el síndrome de abstinencia a THC precipitado por SR 141716A.**

En este estudio se evaluó la existencia de un componente dopaminérgico en las manifestaciones somáticas de la abstinencia a THC. La administración del antagonista SR 141716A a ratones D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup> y D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> tratados crónicamente con THC, precipitó varios síntomas somáticos de abstinencia entre los que se incluyen sacudidas de tronco (Wet dog shakes) y cabeza, temblor de patas, sniffing o aspiraciones, retorcimientos, temblor corporal, ptosis parpebral, masticación, piloerección, ataxia y postura encorvada, que ya habían sido descritos en trabajos anteriores (Hutcheson y cols., 1998; Ledent y cols., 1999; Maldonado y Rodríguez de Fonseca, 2002; Castañe y cols., 2004). La administración del antagonista SR 141716A en ratones tratados con salino precipitó la presencia de algunos signos somáticos leves, similares a los observados durante la abstinencia a cannabinoides, sugiriendo una actividad intrínseca de este compuesto que ya ha sido descrita previamente (Hutcheson y cols., 1998; Rubino y col., 1998).

En los ratones D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup> se observaron efectos significativos del síndrome de abstinencia en 10 de los 12 síntomas somáticos estudiados: sacudidas de tronco y cabeza, temblor de patas, sniffing o aspiraciones, temblor corporal, ptosis parpebral,

masticación, piloerección, ataxia, postura encorvada y retorcimientos. Además, se observaron diferencias significativas en el síndrome de abstinencia global. En los ratones  $D_2R^{-/-}$  se observaron efectos significativos en las sacudidas de tronco y cabeza, temblor de patas, masticación, piloerección, ataxia y síndrome de abstinencia global. Las diferencias fueron menores para otros parámetros del síndrome de abstinencia estudiados, como la postura encorvada, sniffing o aspiraciones y ptosis parpebral. Solamente se observaron diferencias significativas entre los dos genotipos,  $D_2R^{+/+}$  y  $D_2R^{-/-}$ , en las sacudidas de tronco y cabeza, el temblor de patas y el síndrome de abstinencia global. Otros signos evaluados, como diarrea y aseo de genitales, no presentaron diferencias significativas.

Por tanto, los resultados demostraron una disminución significativa de la severidad de la abstinencia a THC en los ratones  $D_2R^{-/-}$ , en los que se observó una reducción notable del *score* global de abstinencia y una disminución en cinco de los doce síntomas individuales estudiados. En consecuencia, los receptores  $D_2$  son importantes para la completa manifestación de la sintomatología somática de la abstinencia.

El sistema dopaminérgico mesolímbico está implicado en las propiedades de recompensa de cannabinoides, así como en las consecuencias motivacionales del síndrome de abstinencia a dichos compuestos. Este síndrome se asocia con cambios compensatorios en la vía del AMPc. Inicialmente, la activación aguda de los receptores  $CB_1$  inhibe la actividad de la adenilato ciclasa, mientras que el síndrome de abstinencia a THC, precipitado por SR 141716A, incrementa la actividad de la adenilato ciclasa *in vivo* (Hutcheson y cols., 1998).

## **5. IMPACTO DE LA INACTIVACIÓN DEL RECEPTOR $D_2$ EN LAS ACCIONES DE LOS PSICOESTIMULANTES.**

Investigaciones previas han demostrado que el receptor dopaminérgico  $D_1$  es uno de los principales receptores implicados en los cambios conductuales, celulares y moleculares inducidos por la administración de cocaína (Moratalla y cols., 1996 a,b; Drago y cols., 1996; Caine y cols., 2007; Gerfen y cols., 2008). Estudios recientes sugieren que los receptores dopaminérgicos son críticos en la sensibilización conductual inducida por cocaína aunque su contribución exacta aún no está establecida (Baik, 2013).

Estudios llevados a cabo en la presente tesis doctoral, proporcionan pruebas sólidas que indican que el receptor dopaminérgico D<sub>2</sub> juega un papel esencial en la sensibilización conductual inducida por cocaína. Y demuestran, asimismo, que es necesaria la integridad del receptor D<sub>2</sub> para la expresión del neuropéptido dinorfina, basal o inducida por cocaína o anfetamina. Por otro lado, nuestros resultados demuestran que la inactivación del receptor D<sub>2</sub> disminuye la inducción del gen de expresión temprana c-fos y la fosforilación de ERK producidos por cocaína y anfetamina.

### **5.1. Disminución de la sensibilización de la actividad locomotora inducida por cocaína o anfetamina en D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>.**

Hemos investigado el papel del receptor dopaminérgico D<sub>2</sub> en la actividad locomotora inducida por dos drogas de abuso, cocaína y anfetamina, utilizando para el estudio ratones carentes del receptor dopaminérgico D<sub>2</sub>. Se evaluó, además, el desarrollo y mantenimiento de la sensibilización de la respuesta motora después de un tratamiento crónico con cocaína o anfetamina.

Experimentos conductuales anteriores han demostrado que administraciones repetidas de cocaína incrementan progresivamente la actividad locomotora en ratones (Martín y cols., 2000), provocando un fenómeno llamado sensibilización motora o comportamental. Dicho fenómeno se prolonga en el tiempo y podría ser la base de la drogadicción (Robinson y Berridge, 1993; Moratalla y cols., 1996a; Steketee y Kalivas, 2011). Estudios llevados a cabo en este trabajo, proporcionan pruebas sólidas que indican que el receptor dopaminérgico D<sub>2</sub> juega un papel esencial en la sensibilización conductual inducida por psicoestimulantes ya que la inactivación de los receptores D<sub>2</sub> disminuye la actividad locomotora inducida por cocaína y anfetamina, confirmando así resultados ya documentados en trabajos previos (Kelly y cols, 1998; Chausmer y cols, 2002).

Por tanto, es necesaria la integridad del receptor D<sub>2</sub> para desarrollar plenamente las acciones hiperlocomotoras y la sensibilización inducidas por la administración de cocaína y anfetamina.

Evaluamos además, el papel de los receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> en la sensibilización motora inducida por la administración aguda de SKF 81297, agonista selectivo del receptor dopaminérgico D<sub>1</sub>. Al igual que en estudios realizados

previamente en ratones  $D_1R^{+/+}$  (Xu y cols, 1994), el tratamiento agudo con SKF 81297 provocó un aumento significativo de la actividad locomotora en ratones  $D_2R^{+/+}$  sin embargo, en los ratones  $D_1R^{-/-}$  no existe aumento de dicha actividad con la administración del agonista selectivo  $D_1$ , SKF 81297 (Xu y cols, 1994). Nuestros resultados ponen de manifiesto que en los ratones  $D_2R^{-/-}$  la ausencia de receptores  $D_2$  da lugar a una reducción significativa del efecto de SKF 81297 sobre la actividad locomotora y estos datos confirman resultados obtenidos en investigaciones anteriores (Usiello y cols., 2000).

En consecuencia, nuestros resultados indican que el receptor  $D_2$  es necesario para las acciones de los psicoestimulantes, o más bien que el receptor  $D_2$  facilita las acciones mediadas por el receptor  $D_1$ , por lo que se explica que en ausencia del receptor  $D_2$  las acciones de la cocaína o anfetamina están en gran parte disminuidas.

## **5.2. La inactivación del receptor dopaminérgico $D_2$ disminuye la expresión de c-Fos.**

Cocaína y anfetamina son psicoestimulantes que inducen genes de expresión temprana en las neuronas del estriado (Robertson y cols, 1989; Graybiel y cols, 1990; Young y cols, 1991; Berke y cols 1998). La expresión de genes tempranos, como el c-Fos, se ha utilizado como un marcador fiable de la actividad neuronal, y se ha demostrado una buena correlación entre la expresión de c-Fos en las neuronas estriatonigrales de la vía directa, cambios bioquímicos (expresión de dinorfina como marcador específico) y el comportamiento inducido por cocaína (Moratalla y cols., 1996a). Además se ha demostrado que el c-fos es, en parte, responsable de los cambios bioquímicos persistentes inducidos por cocaína, y de los cambios estructurales en las neuronas que expresan receptores  $D_1$  (Drago y cols, 1996; Canales y Graybiel, 2000 a,b, Zhang y cols, 2006).

Estudios previos demuestran que la cocaína y la anfetamina no inducen expresión de c-Fos en el estriado de ratones  $D_1R^{-/-}$  (Moratalla y cols, 1996b), por tanto, la activación del receptor  $D_1$  es esencial para la expresión de c-Fos. En este trabajo se ha estudiado el papel del receptor dopaminérgico  $D_2$  en la activación neuronal inducida por cocaína y anfetamina demostrando que la inactivación del receptor  $D_2$  disminuye la inducción del gen de expresión temprana c-Fos pero no la bloquea como ocurre con la

inactivación del receptor D<sub>1</sub>. Sin embargo, en condiciones basales la expresión de c-Fos aumenta en comparación con sus respectivos ratones wild-type.

Estudios previos en ratones D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> con el agonista directo selectivo de receptores D<sub>1</sub>, SKF 81297, demuestran que éste no induce expresión de c-Fos en ratones carentes de dicho receptor (Moratalla y cols, 1996b). En nuestro caso, la administración del agonista en los ratones carentes de receptor D<sub>2</sub> dio lugar a una inducción menor de c-fos, demostrando así que la inactivación del receptor dopaminérgico D<sub>2</sub> disminuyó la expresión de c-Fos inducida por el SKF 81297 pero no la eliminó completamente.

Por tanto, estos resultados demuestran que los receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> desempeñan un papel importante en la activación de c-Fos inducido por psicoestimulantes y apoyan la hipótesis que sostiene que es necesaria la integridad del receptor D<sub>2</sub> para que el receptor D<sub>1</sub> desarrolle plenamente sus acciones.

### **5.3. La inactivación del receptor dopaminérgico D<sub>2</sub> disminuye la fosforilación de ERK inducida por cocaína.**

En el estriado, la administración de psicoestimulantes activa ERK a través de la estimulación combinada de los receptores D<sub>1</sub> y NMDA (Valjent y cols, 2000, 2004, 2005; Salzmann y cols., 2006) e induce la expresión de genes inmediatos como el c-Fos, FosB y zif268 (Graybiel y cols, 1990; Young y cols, 1991; Moratalla y cols, 1993; Berke y cols, 1998), mediante un mecanismo que depende de ERK (Valjent y cols 2000; Brami-Cherrier y cols, 2005). En estriado lesionado con 6-OHDA, la estimulación de los receptores D<sub>1</sub> activa ERK, aumenta la expresión de genes tempranos e induce el desarrollo de disquinesias (Gerfen y cols, 2002; Pavón y cols, 2006; Westin y cols, 2007, Santini y cols., 2007; Darmopil y cols., 2009). Además el SL327, inhibidor selectivo de MEK (MAPK kinasa), bloquea la activación de ERK y la hiperlocomoción inducida por cocaína. Todos estos resultados indican que la activación de ERK, inducida por cocaína, desempeña un papel muy importante en la expresión estriatal de c-fos (Valjent y cols., 2000).

Investigaciones recientes demuestran que la activación de ERK, inducida por la administración de cocaína, se produce selectivamente en las neuronas estriatonigrales de todas las regiones del estriado y núcleo accumbens (Bertran-Gonzalez y cols, 2008). Además, antagonistas del receptor D<sub>2</sub>, como raclopride, disminuyen la activación de



ERK, posiblemente debido a que la dopamina tiene un efecto básico inhibitorio sobre la vía del ERK en neuronas que expresan receptores  $D_2$ . Por otro lado, la estimulación de las proyecciones corticoestriatales activan la fosforilación de ERK en neuronas que expresan receptores  $D_2$  (Gerfen y cols, 2002; Quiroz y cols, 2006). En definitiva, los resultados obtenidos por Bertran-Gonzalez y cols, sugieren que el tono basal dopaminérgico podría reprimir la activación de ERK en neuronas estriatopalidales a través de la estimulación de los receptores  $D_2$ , que podrían actuar oponiéndose a la acción de los receptores de glutamato y  $A_{2a}$ .

Nuestros estudios en ratones modificados genéticamente, demuestran que los niveles básicos de fosforilación de ERK en estriado y corteza fueron más elevados en ratones  $D_2R^{-/-}$  que en  $D_2R^{+/+}$ . Sin embargo, la inactivación del receptor  $D_2$  disminuye la fosforilación de ERK inducida por un tratamiento agudo de cocaína. Estos resultados concuerdan con trabajos anteriores en los que la expresión de ERK disminuye en el estriado dorsolateral de ratones tratados con el antagonista  $D_2$  raclopride (Valjent y cols, 2000) considerando que el antagonista tenga los mismos efectos que la inactivación del receptor.

Por tanto, nuestros resultados indican que los receptores de dopamina  $D_2$  desempeñan un papel importante en la activación de ERK inducida por la administración de cocaína, probablemente a través de la facilitación de  $D_1$ .

#### **5.4. Los receptores dopaminérgicos $D_2$ son críticos para la expresión de dinorfina basal e inducida por psicoestimulantes en el estriado.**

Diferentes estudios sobre inactivación farmacológica y genética han demostrado que la regulación de dinorfina, en el estriado, está acoplada a la activación del receptor dopaminérgico  $D_1$ . El receptor dopaminérgico  $D_1$ , además de colocalizar con dinorfina, modula la expresión de dinorfina basal y la inducida por cocaína (Xu y cols, 1994; Steiner y Gerfen, 1995; Moratalla y cols, 1996b; Drago y cols, 1996). En experimentos anteriores realizados con psicoestimulantes, como la cocaína, se observó un aumento significativo de la expresión de dinorfina en los estriosomas de ratones  $D_1R^{+/+}$ . Por el contrario, la inactivación del receptor  $D_1$  inhibe o disminuye significativamente la expresión de dinorfina en el estriado (Xu y cols., 1994; Moratalla y cols., 1996b; Steiner y Gerfen, 1995; Darmopil y cols., 2009).

En el presente trabajo de investigación y en lo que respecta a la expresión de dinorfina inducida por cocaína o anfetamina en ratones  $D_2R^{-/-}$ , los resultados fueron similares a los obtenidos en ratones  $D_1R^{-/-}$ . Nuestros resultados revelan que el mensajero y la proteína se expresan con mayor intensidad en los estriosomas y en el núcleo accumbens de ratones wild-type y es necesaria la integridad del receptor  $D_2$  para la expresión completa del neuropéptido dinorfina, basal o inducida por cocaína o anfetamina. Por tanto, el receptor  $D_2$ , a pesar de localizarse en las neuronas estriatales de proyección de la vía indirecta, también contribuye a la expresión de dinorfina en las neuronas de la vía directa demostrándose así que los receptores  $D_2$  también juegan un papel esencial en la regulación de dinorfina estriatal por agentes dopaminérgicos.

Por otro lado, nuestros resultados además demuestran que la disminución de dinorfina se produce durante la etapa de transcripción del ARN mensajero.

Dichos resultados no fueron los esperados en principio, ya que la dinorfina, se expresa en las neuronas estriatales que contienen el receptor  $D_1$  pero no en las que contienen el  $D_2$ . Sin embargo, con la inactivación de ambos receptores  $D_1$  y  $D_2$  la expresión de dinorfina estriatal presentó un patrón neuroanatómico similar. La inactivación de los receptores dopaminérgicos  $D_1$  y  $D_2$  afecta principalmente a la expresión de dinorfina en los estriosomas, ya que no se observan cambios en la matriz. Otro aspecto importante es que, aunque el receptor  $D_1$  y el  $D_2$  se distribuyen de forma homogénea en las distintas áreas estriatales, la activación del segundo resulta fundamental sólo para la expresión de dinorfina en los estriosomas. No obstante, también puede ser que la expresión de dinorfina en la matriz esté por debajo de los niveles de detección con las técnicas utilizadas y por tanto, no seamos capaces de documentar los cambios en la expresión de dinorfina en este compartimento.

Todavía se desconocen los mecanismos a través de los cuales los receptores  $D_2$  median la expresión de dinorfina basal y la estimulada por cocaína y anfetamina. No obstante, nuestros experimentos con SKF81297 demostraron que la administración del compuesto en ratones  $D_2R^{-/-}$  no aumentó la actividad locomotora o la expresión de c-fos con la misma intensidad que en los  $D_2R^{+/+}$ . Esto nos lleva a considerar que la disminución en la expresión de dinorfina en ratones  $D_2R^{-/-}$  podría estar mediada por un impedimento en la activación del receptor  $D_1$ , debido a la inactivación del receptor  $D_2$ . La relación funcional y molecular entre ambos receptores aún no se ha dilucidado totalmente, a pesar de la gran cantidad de trabajos dedicados a esta cuestión.

### **5.5. La inactivación del receptor dopaminérgico D<sub>2</sub> aumenta la expresión basal de encefalina, pero no la inducida por cocaína.**

Como se ha demostrado previamente, la depleción de dopamina, el bloqueo o la inactivación del receptor D<sub>2</sub>, origina un incremento de la expresión estriatal de preproencefalina (Pollack y Wooten, 1992 a,b; Baik y cols, 1995; Aoyama y cols, 2000). Nuestros estudios coinciden con estudios previos, que demuestran que los psicoestimulantes inducen ARNm de encefalina en neuronas estriatopallidales (Hurd y Herkenham, 1992; Steiner y Gerfen, 1993; Wang y McGinty, 1996a) y confirman resultados anteriores que ponen de manifiesto que la expresión de encefalina aumentó con la inactivación del receptor D<sub>2</sub> en condiciones basales, pero no se observaron cambios en los ratones tratados con cocaína o anfetamina. Por tanto, la inactivación del receptor dopaminérgico D<sub>2</sub> aumenta la expresión basal de encefalina, pero no la inducida por cocaína.

Estos datos indican que el incremento de encefalina no requiere la activación del receptor D<sub>2</sub> y que, probablemente, depende de la activación de la adenilil ciclasa, ya que el receptor D<sub>2</sub> está acoplado negativamente a ella. Así, la inactivación del D<sub>2</sub> liberaría esta inhibición, resultando en un aumento o acumulación del AMPc intracelular. El AMPc a su vez, activaría esta vía de señalización dependiente de AMPc induciendo la expresión de encefalina mediante la inducción de los factores de transcripción fos y jun en los ratones D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>. Sin embargo la cocaína no fue capaz de aumentar la encefalina en estos ratones. Tampoco se observa un aumento en animales lesionados con 6-OHDA, ni en los tratados con L-DOPA, lo que quizás quiere decir que los niveles de encefalina en ratones D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> han alcanzado un techo, y por eso, ninguna de las manipulaciones farmacológicas estudiadas aumenta estos niveles.

### **5.6. Fenotipo de neuronas estriatales que expresan el gen de expresión temprana c-Fos tras un tratamiento con cocaína.**

Estudios anteriores demuestran que la administración aguda de cocaína induce, en el estriado, la expresión de genes de inducción temprana como el c-Fos, participando así en las alteraciones neuronales a largo plazo (Graybiel y cols., 1990; Moratalla y cols., 1996a, Berke y Hyman, 2000). La cocaína induce expresión de c-Fos principalmente en neuronas de la vía directa que proyectan directamente a la sustancia negra, contienen el receptor dopaminérgico D<sub>1</sub> y expresan el neuropéptido dinorfina. En

las neuronas estriatales de la vía indirecta que expresan el neuropéptido encefalina y contienen receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>, no se expresó c-Fos después de un tratamiento con cocaína (Berretta y cols., 1992; Gerfen y cols., 1995; Moratalla y cols., 1996a). Otros autores han demostrado que aunque la mayor inducción de c-Fos se observe en neuronas que contienen receptores D<sub>1</sub> también existe una ligera expresión en neuronas que contienen el receptor D<sub>2</sub> (Bertran-Gonzalez y cols., 2008).

Nuestros estudios demuestran que en condiciones basales, la inactivación del receptor de dopamina D<sub>2</sub> aumenta la expresión de c-Fos en las neuronas de la vía indirecta o estriatopalidal. Sin embargo, la inactivación del receptor D<sub>2</sub> disminuye la expresión de c-Fos inducida por cocaína. En estudios anteriores se ha demostrado que los antagonistas del receptor D<sub>2</sub> inducen expresión de c-Fos en neuronas estriatales encefalina-positivas que proyectan al globo pálido y median la inhibición motora, sin embargo no se expresa en neuronas dinorfina-positivas (Robertson y cols., 1992; Hiroi y Graybiel, 1996; Hiroi y cols., 2002; Bertran-Gonzalez y cols., 2008).

Por otro lado, el tratamiento con cocaína en ratones D<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup> indujo la expresión de c-Fos principalmente en neuronas dinorfinérgicas. Dichos resultados están de acuerdo con trabajos anteriores que demuestran que la administración de cocaína induce c-Fos en neuronas estriatales dinorfina-positivas pero no en neuronas encefalina-positivas (Moratalla y cols., 1996a; Uslaner y cols., 2001). Estas observaciones son importantes desde el punto de vista de la divergencia anatómica, electrofisiológica y comportamental de las neuronas encefalinérgicas frente a las neuronas dinorfinérgicas. Previamente se ha demostrado que las neuronas encefalinérgicas dan lugar a la vía estriatal indirecta que proyecta al globo pálido y contribuye a la inhibición motora, y las neuronas dinorfinérgicas forman parte de la vía directa que proyecta a la sustancia negra y están implicadas en la activación motora (Graybiel, 1991; Gerfen, 1992). En los ratones D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> tratados con cocaína aumentó la expresión de c-Fos en neuronas dinorfinérgicas y encefalinérgicas. Por tanto, estos resultados demuestran que la inactivación del receptor de dopamina D<sub>2</sub> aumenta la expresión basal de c-Fos en las neuronas de la vía indirecta o estriatopalidal, sin embargo, el tratamiento con cocaína indujo c-Fos en las neuronas dinorfinérgicas, dando lugar a dos poblaciones neuronales c-Fos positivas, las encefalinérgicas que expresan c-Fos de manera constitutiva y las dinorfinérgicas que expresan c-Fos inducido por cocaína.

Esta doble población neuronal podría estar relacionada con la disminución de la actividad locomotora en los ratones  $D_2R^{-/-}$ , ya que la cocaína en los ratones  $D_2R^{+/+}$  aumenta la expresión de c-Fos en neuronas dinorfinérgicas (activación motora) y en los ratones  $D_2R^{-/-}$  aumenta la expresión en ambos tipos neuronales, por tanto, la activación de las neuronas encefalinérgicas contrarrestaría la activación motora disminuyendo la actividad locomotora.

Por tanto, nuestros resultados indican que el receptor  $D_2$  es necesario para que el receptor  $D_1$  pueda desarrollar completamente sus acciones.

Como conclusión general, podemos establecer que el receptor dopaminérgico  $D_2$  facilita las acciones mediadas por el receptor dopaminérgico  $D_1$ .

## ***CONCLUSIONES***



De los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. El ARNm del receptor CB<sub>1</sub> se expresa abundantemente en el estriado y en menor cantidad en el núcleo accumbens. No se detectaron transcritos ni en el globo pálido ni en la sustancia negra.
2. La inmunorreactividad para el receptor CB<sub>1</sub> es baja en el estriado y muy intensa en el globo pálido y la sustancia negra.
3. En el estriado, el ARNm del receptor CB<sub>1</sub> se expresa en las neuronas de proyección de la vía directa (60%) y de la indirecta (40%). También se expresa en las interneuronas parvoalbúmina y GAD<sub>67</sub>. Sin embargo, la expresión del receptor CB<sub>1</sub> es independiente de los receptores dopaminérgicos.
4. El bloqueante de la recaptación de anandamida, AM 404, reduce el grooming y las rotaciones mediadas por el receptor D<sub>1</sub> y los movimientos orales mediados por el receptor D<sub>2</sub>.
5. El grooming inducido por el antagonista SR141716A se bloquea en ratones knock out del receptor D<sub>1</sub>.
6. La inactivación del receptor D<sub>1</sub> disminuye la depresión motora, la analgesia y la hipotermia inducidas por la administración de THC, sin embargo, no interviene en el desarrollo de tolerancia.
7. La inactivación del receptor D<sub>2</sub> aumenta la depresión motora e inhibe el desarrollo de tolerancia inducido por THC. Sin embargo, no modifica la analgesia ni la hipotermia.
8. La inactivación del receptor D<sub>2</sub> no modifica los efectos motivacionales del THC. Aunque disminuye el síndrome de abstinencia precipitado por SR141716A.
9. La inactivación del receptor D<sub>2</sub> disminuye la sensibilidad motora, la expresión de c-Fos y la fosforilación de ERK inducida por cocaína y anfetamina, mediadas por el D<sub>1</sub>.
10. La inactivación del receptor D<sub>2</sub> reduce el efecto motor y la expresión de c-Fos inducidas por SKF 81297.
11. La inactivación del receptor dopaminérgico D<sub>2</sub> inhibe la expresión de dinorfina (basal e inducida por cocaína y anfetamina) mediada por el D<sub>1</sub>. Sin



embargo, aumenta la expresión basal de encefalina, pero no la inducida por cocaína.

12. La inactivación del receptor D<sub>2</sub> aumenta la expresión basal de c-Fos en las neuronas estriatopalidales, sin modificar la inducción fenotípica de c-Fos inducida por cocaína, dando lugar a dos poblaciones neuronales de c-Fos.

Conclusiones generales:

1. En los ganglios basales, el receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> se sintetiza en las neuronas de proyección del estriado y se expresa en el globo pálido y en la sustancia negra.
2. Los cannabinoides endógenos, actuando a través del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> estriatal, juegan un papel importante en la regulación del circuito motor de los ganglios basales.
3. Los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> modulan las acciones de los cannabinoides.
4. El receptor dopaminérgico D<sub>2</sub> facilita las acciones mediadas por el receptor D<sub>1</sub> en condiciones basales y tras el tratamiento con cocaína o anfetamina.

## ***BIBLIOGRAFÍA***



- Aboud ME, Martin BR (1992). Neurobiology of marijuana abuse. *Trends Pharmacol Sci.* 13: 201-6. Review.
- Aceto MD, Scates SM, Lowe JA, Martin BP (2001). Spontaneous and precipitated withdrawal with a synthetic cannabinoid, WIN 55,212-2. *Eur J Pharmacol* 416: 75-81.
- Albin RL, Young AB, Penney JB (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* 12: 366-75. Review.
- Alcacer C, Santini E, Valjent E, Gaven F, Girault JA, Hervé D (2012).  $G\alpha(olf)$  mutation allows parsing the role of cAMP-dependent and extracellular signal-regulated kinase-dependent signaling in L-3,4-dihydroxyphenylalanine-induced dyskinesia. *J Neurosci.* 32: 5900-10.
- Alexander GE, DeLong MR, Strick PL (1986). Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci.*; 9: 357-81. Review.
- Alexander GE, Crutcher MD, DeLong MR (1990a). Basal ganglia-thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, "prefrontal" and "limbic" functions. *Prog Brain Res.* 85: 119-46. Review.
- Alexander GE, Crutcher MD (1990b). Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci.* 13: 266-71. Review.
- Alger BE (2002). Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. *Prog Neurobiol* 68: 247-286.
- Ameri A (1999). The effects of cannabinoids on the brain. *Prog Neurobiol* 58: 315-348.
- Aosaki T, Tsubokawa H, Ishida A, Watanabe K, Graybiel AM, Kimura M (1994). Responses of tonically active neurons in the primate's striatum undergo systematic changes during behavioral sensorimotor conditioning. *J Neurosci.* 14: 3969-84.
- Aoyama S, Kase H, Borrelli E (2000). Rescue of locomotor impairment in dopamine D2 receptor-deficient mice by an adenosine A2A receptor antagonist. *J Neurosci.* 20: 5848-52.
- Ares-Santos S, Granado N, Oliva I, O'Shea E, Martin ED, Colado MI, Moratalla R (2012). Dopamine D(1) receptor deletion strongly reduces neurotoxic effects of methamphetamine. *Neurobiol Dis* 45: 810-20.
- Arvidsson U, Riedl M, Chakrabarti S, Vulchanova L, Lee JH, Nakano AH, Lin X, Loh HH, Law PY, Wessendorf MW, et al (1995). The kappa-opioid receptor is primarily postsynaptic: combined immunohistochemical localization of the receptor and endogenous opioids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92: 5062-6.
- Atwood BK, Mackie K (2010). CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis. *Br J Pharmacol* 160: 467-479.
- Baik JH, Picetti R, Saiardi A, Thiriet G, Dierich A, Depaulis A, Le Meur M, Borrelli E (1995). Parkinsonian-like locomotor impairment in mice lacking dopamine D2 receptors. *Nature.* 377: 424-8.

- Baik JH (2013). Dopamine signaling in reward-related behaviors. *Frontal Neural Circuits* 7: 152
- Bass CE, Martin BR (2000). Time course for the induction and maintenance of tolerance to Delta(9)-tetrahydrocannabinol in mice. *Drug Alcohol Depend.* 60: 113-9.
- Beckstead RM, Kersey KS (1985). Immunohistochemical demonstration of differential substance P-, met-enkephalin-, and glutamic-acid-decarboxylase-containing cell body and axon distributions in the corpus striatum of the cat. *J Comp Neurol.* 232: 481-98.
- Beckstead RM (1988). Association of dopamine D1 and D2 receptors with specific cellular elements in the basal ganglia of the cat: the uneven topography of dopamine receptors in the striatum is determined by intrinsic striatal cells, not nigrostriatal axons. *Neuroscience* 27: 851-63.
- Begg M, Pacher P, Bátkaí S, Osei-Hyiaman D, Offertáler L, Mo FM, Liu J, Kunos G (2005). Evidence for novel cannabinoid receptors. *Pharmacol Ther.* 106: 133-45.
- Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D (1997). Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* 277: 1094-1097.
- Berke JD, Paletzki RF, Aronson GJ, Hyman SE, Gerfen CR (1998). A complex program of striatal gene expression induced by dopaminergic stimulation. *J Neurosci.* 18: 5301-10.
- Berke JD, Hyman SE (2000). Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron.* 25: 515-32.
- Bernácer J, Prensa L, Giménez-Amaya JM (2007). Cholinergic interneurons are differentially distributed in the human striatum. *PLoS One.* 2: e1174.
- Berretta S, Robertson HA, Graybiel AM (1992). Dopamine and glutamate agonists stimulate neuron-specific expression of Fos-like protein in the striatum. *J Neurophysiol.* 68: 767-77.
- Berretta S, Sachs Z, Graybiel AM (1999). Cortically driven Fos induction in the striatum is amplified by local dopamine D<sub>2</sub>-class receptor blockade. *Eur J Neurosci* 11:4309-4319.
- Bertran-Gonzalez J, Bosch C, Maroteaux M, Matamalas M, Hervé D, Valjent E, Girault JA (2008). Opposing patterns of signaling activation in dopamine D1 and D2 receptor-expressing striatal neurons in response to cocaine and haloperidol. *J Neurosci.* 28: 5671-85.
- Bertran-Gonzalez J, Hervé D, Girault JA, Valjent E (2010). What is the Degree of Segregation between Striatonigral and Striatopallidal Projections? *Front Neuroanat.* 4. doi:pii: 136.
- Bevan MD, Hallworth NE, Baufreton J (2007). GABAergic control of the subthalamic nucleus. *Prog Brain Res.* 160: 173-88. Review.
- Bisogno, T., Berrendero, F., Ambrosino, G., Cebeira, M., Ramos, J.A., Fernández-Ruiz, J.J., Di Marzo, V. (1999). Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 256, 377-80.
- Bisogno T, MacCarrone M, De Petrocellis L, Jarrahian A, Finazzi-Agor A, Hillard C, Di Marzo V (2001). The uptake by cells of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous agonist of cannabinoid receptors. *Eur J Biochem* 268: 1982-1989.

- Bouaboula, M., Poinot-Chazel, C., Bourrié, B., Canat, X., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., LeFur, G., Casellas, P. (1995). Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochemistry Journal*. 312: 637-41.
- Brami-Cherrier K, Valjent E, Hervé D, Darragh J, Corvol JC, Pages C, Arthur SJ, Girault JA, Caboche J (2005). Parsing molecular and behavioral effects of cocaine in mitogen- and stress-activated protein kinase-1-deficient mice. *J Neurosci*. 25: 11444-54.
- Breivogel, C.S., Sim, L.J., Childers, S.R. (1997). Regional differences in cannabinoid receptor/Gprotein coupling in rat brain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 282: 1632-42.
- Breuer O, Lawhorn C, Miller T, Smith DM, Brown LL (2005). Functional architecture of the mammalian striatum: mouse vascular and striosome organization and their anatomic relationships. *Neurosci Lett*. 385: 198-203.
- Brown P, Kupsch A, Magill PJ, Sharott A, Harnack D, Meissner W (2002). Oscillatory local field potentials recorded from the subthalamic nucleus of the alert rat. *Exp Neurol*. 177: 581-5.
- Brown AJ (2007). Novel cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol*. 152: 567-75. Review.
- Budney AJ, Hughes JR (2006). The cannabis withdrawal syndrome. *Curr Opin Psychiatry* 19:233-238.
- Bunzow JR, Van Tol HH, Grandy DK, Albert P, Salon J, Christie M, Machida CA, Neve KA, Civelli O (1988). Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA. *Nature*. 336: 783-7.
- Burstein S (2005). PPAR-gamma: a nuclear receptor with affinity for cannabinoids. *Life Sci*. 77: 1674-84. Review.
- Cadogan AK, Alexander SP, Boyd EA, Kendall DA (1997). Influence of cannabinoids on electrically evoked dopamine release and cyclic AMP generation in the rat striatum. *J Neurochem*. 69: 1131-7.
- Caine SB, Thomsen M, Gabriel KI, Berkowitz JS, Gold LH, Koob GF, Tonegawa S, Zhang J, Xu M (2007). Lack of self-administration of cocaine in dopamine D1 receptor knock-out mice. *J Neurosci*. 27: 13140-50.
- Campbell,F.;Tramer,M.R.; Reynolds,D.J. (2001). Are cannabinoids an efective and safe treatment option in the management of pain? A qualitative systematic review. *Bri. Med. J*. 323 : 13-16.
- Canales JJ, Graybiel AM (2000a). A measure of striatal function predicts motor stereotypy. *Nat Neurosci*. 3: 377-83.
- Canales JJ, Graybiel AM (2000b). Patterns of gene expression and behavior induced by chronic dopamine treatments.. *Ann Neurol*. 47: S53-9. Review.
- Canini F, Bourdon L (1998). Dopamine involvement in thermoregulatory responses to heat in rats. *Neurosci Lett*. 241: 91-4.

- Castañé A, Robledo P, Matifas A, Kieffer BL, Maldonado R (2003). Cannabinoid withdrawal syndrome is reduced in double mu and delta opioid receptor knockout mice. *Eur J Neurosci.* 17: 155-9. Erratum in: *Eur J Neurosci.* 17: 427.
- Castañé A, Maldonado R, Valverde O (2004). Role of different brain structures in the behavioural expression of WIN 55,212-2 withdrawal in mice. *Br J Pharmacol.* 142: 1309-17.
- Centonze D, Grande C, Saulle E, Martin AB, Gubellini P, Pavón N, Pisani A, Bernardi G, Moratalla R, Calabresi P (2003). Distinct roles of D1 and D5 dopamine receptors in motor activity and striatal synaptic plasticity. *J Neurosci.* 23: 8506-12.
- Chaperon F, Soubrié P, Puech AJ, Thiébot MH (1998). Involvement of central cannabinoid (CB1) receptors in the establishment of place conditioning in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 135: 324-32.
- Chausmer AL, Elmer GI, Rubinstein M, Low MJ, Grandy DK, Katz JL (2002). Cocaine-induced locomotor activity and cocaine discrimination in dopamine D2 receptor mutant mice. *Psychopharmacology.* 163: 54-61.
- Chen J, Nye HE, Kelz MB, Hiroi N, Nakabeppu Y, Hope BT, Nestler EJ (1995). Regulation of delta FosB and FosB-like proteins by electroconvulsive seizure and cocaine treatments. *Mol Pharmacol.* 48: 880-9.
- Cheer JF, Kendall DA, Marsden CA (2000). Cannabinoid receptors and reward in the rat: a conditioned place preference study. *Psychopharmacology (Berl).* 151: 25-30.
- Chesselet MF, Graybiel AM. Met-enkephalin-like and dynorphin-like immunoreactivities of the basal ganglia of the cat (1983). *Life Sci.* 33 Suppl 1: 37-40.
- Chesselet MF, Graybiel AM (1986). Striatal neurons expressing somatostatin-like immunoreactivity: evidence for a peptidergic interneuronal system in the cat. *Neuroscience.* 17: 547-71.
- Civelli O, Bunzow JR, Grandy DK (1993). Molecular diversity of the dopamine receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 33: 281-307. Review.
- Clayton,N.; Marshall,F.H.; Bountra,C.; O'Shaughnessy,C.T. (2002). CB1 and CB2 cannabinoid receptors are implicated in inflammatory pain. *Pain* 96.3: 253-60.
- Compton, D.R., Johnson, M.R., Meloin, L.S., Martin, B.R. (1991). Pharmacological evaluation of a series of bicyclic cannabinoid analogs: classification as cannabimimetic agents. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 260: 201-209.
- Corchero J, Manzanares J, Fuentes JA (2004). Cannabinoid/opioid crosstalk in the central nervous system. *Crit Rev Neurobiol.* 16: 159-72. Review.
- Cowan RL, Wilson CJ, Emson PC, Heizmann CW (1990). Parvalbumin-containing GABAergic interneurons in the rat neostriatum. *J Comp Neurol.* 302: 197-205.
- Crawley, J.N., Corwin, R.L., Robinson, J.K., Felder, C.C., Devane, W.A., Axelrod, J. (1993). Anandamide, an endogenous ligand of the cannabinoid receptor, induces hypomotility and hypothermia in vivo in rodents. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 46: 967-72.

- Crossman AR (1987). Primate models of dyskinesia: the experimental approach to the study of basal ganglia-related involuntary movement disorders. *Neuroscience*. 21: 1-40. Review.
- Dahlström A, Fuxe K (1964). Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*. 20: 398-9.
- Darmopil S, Muñetón-Gómez VC, de Ceballos ML, Bernson M, Moratalla R (2008). Tyrosine hydroxylase cells appearing in the mouse striatum after dopamine denervation are likely to be projection neurones regulated by L-DOPA. *Eur J Neurosci*. 27: 580-92.
- Darmopil S, Martín AB, De Diego IR, Ares S, Moratalla R (2009). Genetic inactivation of dopamine D1 but not D2 receptors inhibits L-DOPA-induced dyskinesia and histone activation. *Biol Psychiatry*. 66: 603-13.
- DeLong MR (1990). Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci*. 13: 281-5. Review.
- Deniau JM, Mailly P, Maurice N, Charpier S (2007). The pars reticulata of the substantia nigra: a window to basal ganglia output. *Prog Brain Res*. 160: 151-72. Review.
- Derkinderen P, Ledent C, Parmentier M, Girault JA (2001). Cannabinoids activate p38 mitogen-activated protein kinases through CB1 receptors in hippocampus. *J Neurochem* 77:957-960.
- Devane, W.A., Dysarz, F.A., Johnson, M.R., Melvin, L.S., Howlett, A.C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular Pharmacology*. 34: 605-613.
- Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, R.G., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, L.A., Ettinger, A., Mechoulam, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 258, 1946-1949.
- Dewey WL (1986). Cannabinoid pharmacology. *Pharmacol Rev*. 38: 151-78. Review.
- Di Chiara G, Bassareo V, Fenu S, De Luca MA, Spina L, Cadoni C, Acquas E, Carboni E, Valentini V, Lecca D (2004). Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1:227-241.
- Di Chiara V, Errico F, Musella A, Rossi S, Mataluni G, Sacchetti L, Siracusano A, Castelli M, Cavasinni F, Bernardi G, Usiello A, Centonze D (2010). Voluntary exercise and sucrose consumption enhance cannabinoid CB1 receptor sensitivity in the striatum. *Neuropsychopharmacology* 35: 374-87.
- Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D (1994). Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 372:686-691.
- Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Liu J, Batkai S, Jarai Z, Fezza F, Miura GI, Palmiter RD, Sugiura T, Kunos G (2001). Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature*.; 410: 822-825.
- Diana M, Melis M, Muntoni AL, Gessa GL (1998). Mesolimbic dopaminergic decline after cannabinoid withdrawal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 10269-10273.



- Diaz J, Pilon C, Le FB, Gros C, Triller A, Schwartz JC, and Sokoloff P (2000). Dopamine D3 receptors expressed by all mesencephalic dopamine neurons.. *J.Neurosci.*, 20: 8677-8684.
- Difiglia M, Pasik P, Pasik T (1982). A Golgi and ultrastructural study of the monkey globus pallidus. *J Comp Neurol.* 212: 53-75.
- Drago J, Gerfen CR, Westphal H, Steiner H (1996). D1 dopamine receptor-deficient mouse: cocaine-induced regulation of immediate-early gene and substance P expression in the striatum. *Neuroscience* 74: 813-23.
- El-Banoua F, Caraballo I, Flores JA, Galan-Rodriguez B, Fernandez-Espejo E (2004). Effects on turning of microinjections into basal ganglia of D(1) and D(2) dopamine receptors agonists and the cannabinoid CB(1) antagonist SR141716A in a rat Parkinson's model. *Neurobiol Dis.* 16: 377-85.
- El-Ghundi M, Fletcher PJ, Drago J, Sibley DR, O'Dowd BF, and George SR (1999). Spatial learning deficit in dopamine D(1) receptor knockout mice. *Eur.J.Pharmacol.*, 383: 95-106.
- Elsworth JD and Roth RH (1997). Dopamine synthesis, uptake, metabolism, and receptors: relevance to gene therapy of Parkinson's disease. *Exp.Neurol.* 144: 4-9.
- Fattore L, Fadda P, Spano MS, Pistis M, Fratta W (2008). Neurobiological mechanisms of cannabinoid addiction. *Mol Cell Endocrinol* 286(Suppl 1): S97-S107.
- Felder, C.C., Joyce, K.E., Briley, E.M., Mansouri, J., Mackie, K., Blond, O., Lai, Y., Ma, L.A., Mitchell, R.L. (1995). Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Molecular Pharmacology.* 48: 443-450.
- Felder, C.C., Nielsen, A., Briley, E.M., Palkovits, M., Priller, J., Axelrod, J., Nguyen, D.N., Richardson, J.M., Riggan, R.M., Koppel, G.A., Paul, S.M., Becker, G.W. (1996). Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Letters.* 393, 231-5.
- Fernandez-Espejo E, Caraballo I, Rodriguez de Fonseca F, Ferrer B, El Banoua F, Flores JA, Galan-Rodriguez B (2004). Experimental parkinsonism alters anandamide precursor synthesis, and functional deficits are improved by AM 404: a modulator of endocannabinoid function. *Neuropsychopharmacology.* 29: 1134-42.
- Fernandez-Espejo E, Caraballo I, de Fonseca FR, El Banoua F, Ferrer B, Flores JA, Galan-Rodriguez B (2005). Cannabinoid CB1 antagonists possess antiparkinsonian efficacy only in rats with very severe nigral lesion in experimental parkinsonism. *Neurobiol Dis.* 18: 591-601.
- Fernández-Ruiz, J.J., Lastres-Becker, I., Cabranes, A., Gonzalez, S., Ramos, J.A. (2002). Endocannabinoids and basal ganglia functionality. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* 66: 257-67.
- Fernández-Ruiz J, González S (2005). Cannabinoid control of motor function at the basal ganglia. In: Pertwee RG (ed.). *Handbook of Experimental Pharmacology – 168 – Cannabinoids.* Springer-Verlag: Heidelberg, pp. 479–507.

- Fink JS, Weaver DR, Rivkees SA, Peterfreund RA, Pollack AE, Adler EM, Reppert SM (1992). Molecular cloning of the rat A2 adenosine receptor: selective co-expression with D2 dopamine receptors in rat striatum. *Brain Res Mol Brain Res*. 14: 186-95.
- Fitton AG, Pertwee RG (1982). Changes in body temperature and oxygen consumption rate of conscious mice produced by intrahypothalamic and intracerebroventricular injections of delta 9-tetrahydrocannabinol. *Br J Pharmacol*. 75: 409-14.
- Freneau RT, Jr., Duncan GE, Fornaretto MG, Dearry A, Gingrich JA, Breese GR, and Caron MG (1991). Localization of D1 dopamine receptor mRNA in brain supports a role in cognitive, affective, and neuroendocrine aspects of dopaminergic neurotransmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88: 3772-3776.
- French ED, Dillon K, Wu X (1997). Cannabinoids excite dopamine neurons in the ventral tegmentum and substantia nigra. *Neuroreport*. 8: 649-52.
- Fride, E., Mechoulam, R. (1993). Pharmacological activity of the cannabinoid receptor agonist, anandamide, a brain constituent. *European Journal of Pharmacology*. 231: 313-4.
- Fride, E., Ffox, A., Rosenberg, E., Faigenboim, M., Cohen, V., Barda, L., Blau, H., Mechoulam, R. (2003). Milk intake and survival in newborn cannabinoid CB(1) receptor knockout mice: evidence for a "CB(3)" receptor. *European Journal of Pharmacology*. 461: 27-34.
- Galiegue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carriere D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, Casellas P (1995). Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem* 232: 54-61.
- Gaoni Y, Mechoulam R (1964). Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc* 86: 1646-1647.
- García-Gutiérrez MA, Manzanares J (2010). Overexpression of CB2 cannabinoid receptors decreased vulnerability to anxiety and impaired anxiolytic action of alprazolam in mice. *J Psychopharmacol* 24: 757-765.
- García-Gutiérrez MS, Pérez-Ortiz JM, Gutiérrez-Adán A, Manzanares J (2010). Depression-resistant endophenotype in mice overexpressing cannabinoid CB(2) receptors. *Br J Pharmacol* 160: 1773-1784.
- Gerdeman G, Lovinger DM (2001). CB1 cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsolateral striatum. *J Neurophysiol* 85: 468-471.
- Gerdeman GL, Fernández-Ruiz J (2008). The endocannabinoid system in the physiology and pathophysiology of the basal ganglia. In: Kofalvi A (ed.). *Cannabinoids and the Brain*. Springer-Verlag: New York, NY, pp. 423–483.
- Gerfen CR (1984). The neostriatal mosaic: compartmentalization of corticostriatal input and striatonigral output systems. *Nature*. 311: 461-4.
- Gerfen CR (1985). The neostriatal mosaic. I. Compartmental organization of projections from the striatum to the substantia nigra in the rat. *J Comp Neurol*. 236: 454-76.
- Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ Jr, Sibley DR (1990). D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal

- neurons. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250: 1429-32.
- Gerfen CR. The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization (1992). *Trends Neurosci.* 15: 133-9.
- Gerfen CR, Keefe KA, Gauda EB (1995). D1 and D2 dopamine receptor function in the striatum: coactivation of D1- and D2-dopamine receptors on separate populations of neurons results in potentiated immediate early gene response in D1-containing neurons. *J Neurosci.* 15: 8167-76.
- Gerfen CR (2000). Molecular effects of dopamine on striatal-projection pathways. *Trends Neurosci.* 23: S64-70. Review.
- Gerfen CR, Miyachi S, Paletzki R, Brown P (2002). D1 dopamine receptor supersensitivity in the dopamine-depleted striatum results from a switch in the regulation of ERK1/2/MAP kinase. *J Neurosci.* 22: 5042-54.
- Gerfen CR, Paletzki R, Worley P (2008). Differences between dorsal and ventral striatum in *Drd1a* dopamine receptor coupling of dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein-32 to activation of extracellular signal-regulated kinase. *J Neurosci* 28: 7113-20.
- Gerfen CR, Surmeier DJ (2011). Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annu Rev Neurosci.* 34:441-66. Review.
- Gessa GL, Melis M, Muntoni AL, Diana M (1998). Cannabinoids activate mesolimbic dopamine neurons by an action on cannabinoid CB1 receptors. *Eur J Pharmacol* 341: 39-44.
- Gingrich JA, Caron MG (1993). Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Annu Rev Neurosci.* 16: 299-321. Review.
- Giuffrida A, Parsons LH, Kerr TM, Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Piomelli D (1999). Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nat Neurosci* 2:358-363.
- Giuffrida, A., Piomelli, D. (2000). The endocannabinoid system: a physiological perspective on its role in psychomotor control. *Chemistry and Physics of Lipids.* 108: 151-8.
- Glass, M., Brotchie, J.M., Maneuf, Y.P. (1997). Modulation of neurotransmission by cannabinoids in the basal ganglia. *European Journal of Neuroscience.* 9: 199-203.
- Glass M, Felder CC (1997). Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor. *J Neurosci* 17: 5327-5333.
- González S, Romero J, de Miguel R, Lastres-Becker I, Villanua MA, Makriyannis A, Ramos JA, Fernández-Ruiz JJ (1999). Extrapyramidal and neuroendocrine effects of AM404, an inhibitor of the carrier-mediated transport of anandamide. *Life Sci.* 65: 327-36.
- Granado N, Escobedo I, O'Shea E, Colado I, Moratalla R (2008a). Early loss of dopaminergic terminals in striosomes after MDMA administration to mice. *Synapse.* 62: 80-4.

- Granado N, Ortiz O, Suarez LM, Martín ED, Cena V, Solis JM, and Moratalla R (2008b). D1 but not D5 Dopamine Receptors Are Critical for LTP, Spatial Learning, and LTP-Induced arc and zif268 Expression in the Hippocampus.. *Cereb.Cortex*, 18: 1-12.
- Granado N, Ares-Santos S, O'Shea E, Vicario-Abejón C, Colado MI, Moratalla R (2010). Selective vulnerability in striosomes and in the nigrostriatal dopaminergic pathway after methamphetamine administration : early loss of TH in striosomes after methamphetamine. *Neurotox Res*. 18: 48-58.
- Granado N, Ares-Santos S, Oliva I, O'Shea E, Martin ED, Colado MI, Moratalla R (2011). Dopamine D2-receptor knockout mice are protected against dopaminergic neurotoxicity induced by methamphetamine or MDMA. *Neurobiol Dis*. 42: 391-403.
- Grande C, Zhu H, Martin AB, Lee M, Ortiz O, Hiroi N, Moratalla R (2004). Chronic treatment with atypical neuroleptics induces striosomal FosB/DeltaFosB expression in rats. *Biol Psychiatry*. Mar 55: 457-63.
- Graybiel AM, Ragsdale CW Jr (1978). Histochemically distinct compartments in the striatum of human, monkeys, and cat demonstrated by acetylthiocholinesterase staining. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 75: 5723-6.
- Graybiel AM, Moratalla R (1989). Dopamine uptake sites in the striatum are distributed differentially in striosome and matrix compartments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86: 9020-4.
- Graybiel AM (1990). Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci*. 13: 244-254.
- Graybiel AM, Moratalla R, Robertson HA (1990). Amphetamine and cocaine induce drug-specific activation of the c-fos gene in striosome-matrix compartments and limbic subdivisions of the striatum. *Proc Natl Acad Sci* 87: 6912-6.
- Graybiel AM. Basal ganglia--input, neural activity, and relation to the cortex (1991). *Curr Opin Neurobiol*. 1: 644-51.
- Graybiel AM, Aosaki T, Flaherty AW, Kimura M (1994). The basal ganglia and adaptive motor control. *Science*. 265: 1826-31. Review.
- Guan X, Tao J (2009). Dopamine D1 receptor, but not dopamine D2 receptor, is a critical regulator for acute cocaine-enhanced gene expresión. Li S. *Neurol Res*. 31: 17-22.
- Gubellini P, Picconi B, Bari M, Battista N, Calabresi P, Centonze D, Bernardi G, Finazzi-Agrò A, Maccarrone M (2002). Experimental parkinsonism alters endocannabinoid degradation: implications for striatal glutamatergic transmission. *J Neurosci*. 2002 22: 6900-7.
- Gudermann T, Schöneberg T, Schultz G (1997). Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors. *Annu Rev Neurosci*. 20: 399-427. Review.
- Guindon J, Beaulieu P (2006). Antihyperalgesic effects of local injections of anandamide, ibuprofen, rofecoxib and their combinations in a model of neuropathic pain. *Neuropharmacology* 50: 814-23.

- Hanus, L., Abu-Lafi, S., Fride, E., Breuer, A., Vogel, Z., Shalev, D.E., Kustanovich, I., Mechoulam, R. (2001). 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proceedings in National Academy of Science U.S.A.* 98, 3662-5.
- Harrison MB, Tissot M, Wiley RG (1996). Expression of m1 and m4 muscarinic receptor mRNA in the striatum following a selective lesion of striatonigral neurons. *Brain Res.* 734: 323-6.
- Herkenham M, Pert CB (1981). Mosaic distribution of opiate receptors, parafascicular projections and acetylcholinesterase in rat striatum. *Nature.* 291: 415-8.
- Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1932-1936.
- Herkenham M, Lynn AB, de Costa BR, Richfield EK (1991a). Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat. *Brain Res* 547: 267-274.
- Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC (1991b). Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci* 11: 563-583.
- Hermann H, Marsicano G, Lutz B (2002). Coexpresion of the cannabinoid receptor type I with dopamine and serotonin receptors in distinct neuronal subpopulations of the adult mouse forebrain. *Neuroscience* 109: 451-460.
- Hiroi N, White NM (1991). The amphetamine conditioned place preference: differential involvement of dopamine receptor subtypes and two dopaminergic terminal areas. *Brain Res.* 552: 141-52.
- Hiroi N, Graybiel AM (1996). Atypical and typical neuroleptic treatments induce distinct programs of transcription factor expression in the striatum. *J Comp Neurol.* 374: 70-83.
- Hiroi N, Martín AB, Grande C, Alberti I, Rivera A, Moratalla R (2002). Molecular dissection of dopamine receptor signaling. *J Chem Neuroanat.* 23: 237-42.
- Hohmann AG, Herkenham M (2000). Localization of cannabinoid CB(1) receptor mRNA in neuronal subpopulations of rat striatum: a double-label in situ hybridization study. *Synapse* 37: 71-80.
- Hohmann AG (2002). Spinal and peripheral mechanisms of cannabinoid antinociception: behavioral, neurophysiological and neuroanatomical perspectives. *Chem Phys Lipids* 121:173-190.
- Hojo M, Sudo Y, Ando Y, Minami K, Takada M, Matsubara T, Kanaide M, Taniyama K, Sumikawa K, Uezono Y (2008). mu-Opioid receptor forms a functional heterodimer with cannabinoid CB1 receptor: electrophysiological and FRET assay analysis. *J Pharmacol Sci* 108: 308-319.
- Howlett, A.C., Johnson, M.R., Melvia, L.S., Milhe, G.M. (1988). Nonclassical cannabinoid analgetic inhibit adenylate cyclase: development of a cannabinoid receptor model. *Molecular Pharmacology.* 33: 297-302.
- Howlett AC (1998). The CB1 cannabinoid receptor in the brain. *Neurobiol Dis* 5:405-416.

- Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 54: 161-202.
- Howlett AC (2005). Cannabinoid receptor signaling. *Handb Exp Pharmacol* 168: 53-79.
- Huang CC, Lo SW, Hsu KS (2001). Presynaptic mechanisms underlying cannabinoid inhibition of excitatory synaptic transmission in rat striatal neurons. *J Physiol* 532: 731-748.
- Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, Tognetto M, Petros TJ, Krey JF, Chu CJ, Miller JD, Davies SN, Geppetti P, Walker JM, Di Marzo V (2002). An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 8400-8405.
- Hurd YL, Herkenham M (1992). Influence of a single injection of cocaine, amphetamine or GBR 12909 on mRNA expression of striatal neuropeptides. *Brain Res Mol Brain Res*. 16: 97-104.
- Hutcheson DM, Tzavara ET, Smadja C, Valjent E, Roques BP, Hanoune J, Maldonado R (1998). Behavioural and biochemical evidence for signs of abstinence in mice chronically treated with delta-9-tetrahydrocannabinol. *Br J Pharmacol*. 125: 1567-77.
- Ibrahim MM, Porreca F, Lai J, Albrecht PJ, Rice FL, Khodorova A, Davar G, Makriyannis A, Vanderah TW, Mata HP, Malan TP Jr (2005). CB2 cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids. *PNAS* 102: 3093-8.
- Jackson DM, Westlind-Danielsson A (1994). Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. *Pharmacol Ther*. 64: 291-370. Review.
- Jamshidi N, Taylor DA (2001). Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. *Br J Pharmacol*.; 134: 1151-1154.
- Julian MD, Martin AB, Cuellar B, Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Moratalla R and Garcia-Segura LM (2003). Neuroanatomical relationship between type 1 cannabinoid receptors and dopaminergic systems in the rat basal ganglia. *Neuroscience* 119(1): 309-318.
- Kearn CS, Blake-Palmer K, Daniel E, Mackie K, Glass M. (2005) Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors enhances heterodimer formation: a mechanism for receptor cross-talk? *Mol Pharmacol* 67: 1697-1704.
- Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimoto-dani Y, Uchigashima M, Watanabe M (2009). Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev* 89: 309-380.
- Kawaguchi Y, Wilson CJ, Emson PC (1990). Projection subtypes of rat neostriatal matrix cells revealed by intracellular injection of biocytin. *J Neurosci*. 10: 3421-38.
- Kawaguchi Y (1993). Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *J Neurosci*. 13: 4908-23.
- Kawaguchi Y (1997). Selective cholinergic modulation of cortical GABAergic cell subtypes. *J Neurophysiol*. 78: 1743-7.

- Keefe KA, Gerfen CR (1995). D1-D2 dopamine receptor synergy in striatum: effects of intrastratial infusions of dopamine agonists and antagonists on immediate early gene expression. *Neuroscience*. 66: 903-13.
- Kelly MA, Rubinstein M, Asa SL, Zhang G, Saez C, Bunzow JR, Allen RG, Hnasko R, Ben-Jonathan N, Grandy DK, Low MJ (1997). Pituitary lactotroph hyperplasia and chronic hyperprolactinemia in dopamine D2 receptor-deficient mice. *Neuron*. Jul 19: 103-13.
- Kelly MA, Rubinstein M, Phillips TJ, Lessov CN, Burkhart-Kasch S, Zhang G, Bunzow JR, Fang Y, Gerhardts GA, Grandy DK, Low MJ (1998). Locomotor activity in D2 dopamine receptor-deficient mice is determined by gene dosage, genetic background, and developmental adaptations. *J Neurosci*. 18: 3470-9.
- Khan ZU, Gutierrez A, Martín R, Penafiel A, Rivera A, de la Calle A (2000). Dopamine D5 receptors of rat and human brain. *Neuroscience*, 100:689-699.
- Kitai ST, Deniau JM (1981). Cortical inputs to the subthalamus: intracellular análisis *Brain Res*. 214: 411-5.
- Klein TW, Friedman H, Specter S (1998). Marijuana, immunity and infection. *Journal Neuroimmunology*. 83: 102-15.
- Klein, T.W., Newton, C.A., Friedman, H. (2001). Cannabinoids and the immune system. *Pain Research Management*. 6: 95-101.
- Koob GF (1992). Neural mechanisms of drug reinforcement. *Ann NY Acad Sci*. 654: 171-191
- Kreitzer AC (2009). Physiology and pharmacology of striatal neurons. *Annu Rev Neurosci*. 32: 127-47. Review.
- Kubota Y, Kawaguchi Y (1993). Spatial distributions of chemically identified intrinsic neurons in relation to patch and matrix compartments of rat neostriatum. *J Comp Neurol*. 332: 499-513.
- Ledent C, Valverde O, Cossu G, Petitet F, Aubert JF, Beslot F, Böhme GA, Imperato A, Pedrazzini T, Roques BP, Vassart G, Fratta W, Parmentier M (1999). Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* 283: 401-4.
- Lee AM, Oleson EB, Diergaarde L, Cheer JF, Pattij T. (2012). Cannabinoids and value-based decision making: implications for neurodegenerative disorders. *Basal Ganglia* 2: 131-138.
- Le Moine C, Bloch B (1995). D1 and D2 dopamine receptor gene expression in the rat striatum: sensitive cRNA probes demonstrate prominent segregation of D1 and D2 mRNAs in distinct neuronal populations of the dorsal and ventral striatum. *J Comp Neurol*. 355: 418-26.
- Lichtman AH, Dimen KR, Martin BR (1995). Systemic or intrahippocampal cannabinoid administration impairs spatial memory in rats. *Psychopharmacol*. 119: 282-290.

- Little, PJ, Compton, DR, Jonshon, MR Martin, BR (1988). Pharmacology and stereoselectivity of structurally novel cannabinoids in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 247: 1046-1051.
- Maccarrone M, Battista N, Centonze D (2007). The endocannabinoid pathway in Huntington's disease: a comparison with other neurodegenerative diseases. *Prog Neurobiol.* 81: 349-79. Review.
- Mackie, K., Hille, B. (1992). Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Science. USA.* 89: 3825-3829.
- Mackie, K., Lai, Y., Westenbroek, R., Mitchell, R. (1995). Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *Journal of Neuroscience.* 15: 6552-61.
- Madroñal N, Gruart A, Valverde O, Espadas I, Moratalla R, Delgado-García JM (2012). Involvement of cannabinoid CB1 receptor in associative learning and in hippocampal CA3-CA1 synaptic plasticity. *Cereb Cortex.* 22: 550-66.
- Mailleaux P, Vanderhaeghen JJ (1992). Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience* 48: 655-668.
- Mailleux, P., Vanderhaeghen, J.J. (1993). Dopaminergic regulation of cannabinoid receptor mRNA levels in the rat caudate-putamen: an in situ hybridization study. *Journal of Neurochemistry.* 61: 1705-1712.
- Malan, T.P.; Ibrahim, M.M.; Lai, J.; Vanderah, T.W.; Makriyannis, A.; Porreca, F. (2003). CB2 cannabinoid receptor agonists: pain relief without psychoactive effects? *Curr Opin Pharmacol.* 3: 62-7
- Maldonado R (2002). Study of cannabinoid dependence in animals. *Pharmacol Ther* 95: 153-164.
- Maldonado R, Rodríguez de Fonseca F (2002). Cannabinoid addiction: behavioral models and neural correlates. *J Neurosci.* 22: 3326-31. Review.
- Maldonado R, Valverde O, Berrendero F (2006). Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. *Trends Neurosci* 29: 225-232.
- Mallet PE, Beninger RJ (1998). Delta9-tetrahydrocannabinol, but not the endogenous cannabinoid receptor ligand anandamide, produces conditioned place avoidance. *Life Sci.* 62: 2431-9.
- Malone DT, Taylor DA (1998). Modulation of delta9-tetrahydrocannabinol-induced hypothermia by fluoxetine in the rat. *Br J Pharmacol.* 124: 1419-24.
- Mansour A, Khachaturian H, Lewis ME, Akil H, Watson SJ (1988). Anatomy of CNS opioid receptors. *Trends Neurosci* 11: 308-14.



- Mansour, A., Meador-Woodruff, J.H., Zhou, Q., Civelli, O., Akil, H., Watson, S.J. (1992). A comparison of D1 receptor binding and mRNA in rat brain using receptor autoradiographic and in situ hybridization techniques. *Neuroscience*. 46: 959-71.
- Manzanares J, Corchero J, Romero J, Fernández-Ruiz JJ, Ramos JA, Fuentes JA (1999). Pharmacological and biochemical interactions between opioids and cannabinoids. *Trends Pharmacol Sci*. 20: 287-94. Review.
- Manzanares J, Julian M, Carrascosa A (2006). Role of the cannabinoid system in pain control and therapeutic implications for the management of acute and chronic pain episodes. *Curr Neuropharmacol*. 4: 239-57.
- Marinissen MJ, Gutkind JS (2001). G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci*. 22: 368-76. Review.
- Martin M, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O (2000). Cocaine, but not morphine, induces conditioned place-preference and sensitization to locomotor responses in CB1 knockout mice. *Eur J Neurosci*. 12: 4038-46.
- Martín AB, Fernandez-Espejo E, Ferrer B, Gorriti MA, Bilbao A, Navarro M, Rodriguez de Fonseca F, Moratalla R (2008). Expression and function of CB1 receptor in the rat striatum: localization and effects on D1 and D2 dopamine receptor-mediated motor behaviors. *Neuropsychopharmacology*. 33: 1667-79.
- Marsicano G, Lutz B (1999). Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur J Neurosci* 11: 4213-4225.
- Massi P, Vaccani A, Romorini S, Parolaro D (2001). Comparative characterization in the rat of the interaction between cannabinoids and opiates for their immunosuppressive and analgesic effects. *J Neuroimmunol* 117: 116-24
- Matamales M, Bertran-Gonzalez J, Salomon L, Degos B, Deniau JM, Valjent E, Hervé D, Girault JA (2009). Striatal medium-sized spiny neurons: identification by nuclear staining and study of neuronal subpopulations in BAC transgenic mice. *PLoS One*. 4: e4770.
- Matias I, Gonthier MP, Orlando P, Martiadis V, De Petrocellis L, Cervino C, Petrosino S, Hoareau L, Festy F, Pasquali R, Roche R, Maj M, Pagotto U, Monteleone P, Di Marzo V (2006). Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and betapancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *J Clin Endocrinol Metab.*; 91: 3171-3180.
- Mato S, Chevalleyre V, Robbe D, Pazos A, Castillo PE, Manzoni OJ (2004). A single in-vivo exposure to delta 9THC blocks endocannabinoid-mediated synaptic plasticity. *Nat Neurosci*. 7: 585-586.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346: 561-564.
- Matsuda LA, Bonner TI, Lolait SJ (1993). Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *J Comp Neurol* 327: 535-550.
- Meador-Woodruff JH (1994). Update on dopamine receptors. *Ann.Clin.Psychiatry*, 6: 79-90.

- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N.E., Schatz, A.R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B.R., Compton, D.R., Pertwee, R.G., Griffin, G., Bayewitch, M., Barg, J., Vogel, Z. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology*. 50: 83-90.
- Meredith GE, Baldo BA, Andrezjewski ME, Kelley AE (2008). The structural basis for mapping behavior onto the ventral striatum and its subdivisions. *Brain Struct Funct*. 213: 17-27. Review.
- Meschler JP, Howlett AC (2001). Signal transduction interactions between CB1 cannabinoid and dopamine receptors in the rat and monkey striatum. *Neuropharmacology* 40: 918-926.
- Mezey E, Toth ZE, Cortright DN, Arzubi MK, Krause JE, Elde R, Guo A, Blumberg PM, Szallasi A. (2000). Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 3655–3660.
- Miller AS, Sanudo-Pena MC, Walker JM (1998). Ipsilateral turning behavior induced by unilateral microinjections of a cannabinoid into the rat subthalamic nucleus. *Brain Res* 793: 7-11.
- Mink JW (1996). The basal ganglia: focused selection and inhibition of competing motor programs. *Prog Neurobiol*. 50: 381-425. Review.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev*. 78: 189-225. Review.
- Mishima K, Egashira N, Hirosawa N, Fujii M, Matsumoto Y, Iwasaki K, Fujiwara M (2001). Characteristics of learning and memory impairment induced by delta-9-tetrahydrocannabinol in rats. *Jpn J Pharmacol*. 87: 297–308.
- Misner DL, Sullivan JM (1999). Mechanism of cannabinoid effects on long-term potential and depression in hippocampal CA1 neurons. *J Neurosci*. 19: 6795–6805.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev*. 78: 189-225. Review.
- Moldrich G, Wenger T (2000). Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain: an immunohistochemical study. *Peptides* 21: 1735-1742.
- Molloy AG, Waddington JL (1987). Assessment of grooming and other behavioural responses to the D-1 dopamine receptor agonist SK & F 38393 and its R- and S-enantiomers in the intact adult rat. *Psychopharmacol* 92: 164-8.
- Monory K, Massa F, Egertová M, Eder M, Blaudzun H, Westenbroek R, Kelsch W, Jacob W, Marsch R, Ekker M, Long J, Rubenstein JL, Goebbels S, Nave KA, During M, Klugmann M, Wölfel B, Dodt HU, Zieglgänsberger W, Wotjak CT, Mackie K, Elphick MR, Marsicano G, Lutz B (2006). The endocannabinoid system controls key epileptogenic circuits in the hippocampus. *Neuron* 51: 455-466.
- Monory K, Blaudzun H, Massa F, Kaiser N, Lemberger T, Schütz G, Wotjak CT, Lutz B, Marsicano G. (2007). Genetic dissection of behavioural and autonomic effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol in mice. *PLoS Biol*. 5: e269.

- Moratalla R, Robertson HA, Graybiel AM (1992). Dynamic regulation of NGFI-A (zif268, egr1) gene expression in the striatum. *J Neurosci.* 12: 2609-22.
- Moratalla R, Vickers EA, Robertson HA, Cochran BH, Graybiel AM (1993). Coordinate expression of c-fos and jun B is induced in the rat striatum by cocaine. *J Neurosci.* 13: 423-33.
- Moratalla R, Elibol B, Vallejo M and Graybiel AM (1996a). Network-level changes in expression of inducible Fos-Jun proteins in the striatum during chronic cocaine treatment and withdrawal. *Neuron* 17: 147-156.
- Moratalla R, Xu M, Tonegawa S and Graybiel AM (1996b). Cellular responses to psychomotor stimulant and neuroleptic drugs are abnormal in mice lacking the D1 dopamine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14928-14933.
- Moratalla R (2002). Receptores dopaminérgicos implicados en la plasticidad sináptica del estriado. *Neurología* 17: 37-45.
- Morelli M, Cozzolino A, Pinna A, Fenu S, Carta A, Di Chiara G (1993). L-dopa stimulates c-fos expression in dopamine denervated striatum by combined activation of D-1 and D-2 receptors. *Brain Res.* 623: 334-6.
- Morera-Herreras T, Miguelez C, Aristieta A, Ruiz-Ortega JÁ, Ugedo L (2012). Endocannabinoid modulation of dopaminergic motor circuits. *Front Pharmacol.* 3: 110.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365: 61-65.
- Nambu A, Tokuno H, Inase M, Takada M (1997). Corticosubthalamic input zones from forelimb representations of the dorsal and ventral divisions of the premotor cortex in the macaque monkey: comparison with the input zones from the primary motor cortex and the supplementary motor area. *Neurosci Lett.* 239: 13-6.
- Nava F, Carta G, Gessa GL (2000). Permissive role of dopamine D(2) receptors in the hypothermia induced by delta(9)-tetrahydrocannabinol in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 66: 183-7.
- Navarro M, Fernández-Ruiz JJ, De Miguel R, Hernández ML, Cebeira M, Ramos JA (1993). Motor disturbances induced by an acute dose of delta 9-tetrahydrocannabinol: possible involvement of nigrostriatal dopaminergic alterations. *Pharmacol Biochem Behav.* 45: 291-8.
- Navarro M, Carrera MR, Fratta W, Valverde O, Cossu G, Fattore L, Chowen JA, Gomez R, del Arco I, Villanua MA, Maldonado R, Koob GF, Rodriguez de Fonseca F (2001). Functional interaction between opioid and cannabinoid receptors in drug self-administration. *J Neurosci.* 21: 5344-50.
- Nestler EJ (2004). Historical review: Molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *Trends Pharmacol Sci.* 25: 210-8.
- Núñez E, Benito C, Pazos MR, Barbachano A, Fajardo O, González S, Tolon RM, Romero J (2004). Cannabinoid CB2 receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study. *Synapse* 53:208-213.

- O'Dowd BF (1993). Structures of dopamine receptors. *J Neurochem.* Mar;60(3):804-16. Review.
- Onaivi ES, Ishiguro H, Gong JP, Patel S, Meozzi PA, Myers L, Perchuk A, Mora Z, Tagliaferro PA, Gardner E, Brusco A, Akinshola BE, Hope B, Lujilde J, Inada T, Iwasaki S, Macharia D, Teasenfitz L, Arinami T, Uhl GR (2008). Brain neuronal CB2 cannabinoid receptors in drug abuse and depression: from mice to human subjects. *PLoS One.* 3: e1640.
- Ortiz O, Delgado-García JM, Espadas I, Bahí A, Trullas R, Dreyer JL, Gruart A, Moratalla R (2010). Associative learning and CA3-CA1 synaptic plasticity are impaired in D1R null, *Drd1a*<sup>-/-</sup> mice and in hippocampal siRNA silenced *Drd1a* mice. *J Neurosci.* 30: 12288-300.
- Packard MG, Knowlton BJ (2002). Learning and memory functions of the Basal Ganglia. *Annu Rev Neurosci.* 25: 563-93. Review.
- Panlilio LV, Justinová Z, Goldberg SR (2010). Animal models of cannabinoid reward. *Br J Pharmacol.* 160: 499-510.
- Parent A, Hazrati LN (1995). Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res Brain Res Rev.* 20: 91-127. Review.
- Parent A, Hazrati LN (1995). Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Res Brain Res Rev.* 20: 128-54. Review.
- Parker LA, Gillies T (1995). THC-induced place and taste aversions in Lewis and Sprague-Dawley rats. *Behav Neurosci.* 109: 71-8.
- Parolaro D, Rubino T, Viganò D, Massi P, Guidali C, Realini N (2010). Cellular Mechanisms Underlying the Interaction between Cannabinoid and Opioid System. *Curr Drug Targets.* 11: 393-405.
- Paul ML, Graybiel AM, David JC, Robertson HA (1992). D1-like and D2-like dopamine receptors synergistically activate rotation and c-fos expression in the dopamine-depleted striatum in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci.* 12: 3729-42.
- Pavón N, Martín AB, Mendiadua A, Moratalla R (2006). ERK phosphorylation and FosB expression are associated with L-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian mice. *Biol Psychiatry.* 59: 64-74.
- Pert CB, Kuhar MJ, Snyder SH (1976). Opiate receptor: autoradiographic localization in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 73: 3729-33.
- Pertwee, R.G., Greentree, S.G., Swwift, P.A. (1988). Drugs which stimulate or facilitate central GABAergic transmission interact synergistically with  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol to produce marked catalepsy in mice. *Neuropharmacology.* 27: 1256-1270.
- Pertwee RG, Marshall NR, Macdonald AG (1990). Behavioural thermoregulation in mice: effects of low doses of general anaesthetics of different potency. *Exp Physiol.* 75: 629-37.

- Pertwee, R.G., Ross, T.M. (1991). Drugs which stimulate or facilitate central cholinergic transmission interact synergistically with delta-9-tetrahydrocannabinol to produce marked catalepsy in mice. *Neuropharmacology*. 30: 67-71.
- Pertwee, R.G., Wickens, A.P. (1991). Enhancement by chlordiazepoxide of catalepsy induced in rats by intravenous or intrapallidal injections of enantiomeric cannabinoids. *Neuropharmacology*. 30: 237-244.
- Pertwee RG (1997). Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther*. 74: 129-80. Review.
- Pertwee RG (2001). Cannabinoid receptors and pain. *Prog Neurobiol*. 63: 569-611. Review.
- Pertwee RG (2001b). Canabinoid and the gastrointestinal tract. *Gut*.; 48: 859-867.
- Pertwee RG (2007). GPR55: a new member of the cannabinoid receptor clan? *Br J Pharmacol*. 152: 984-6. Review.
- Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SP, Di Marzo V, Elphick MR, Greasley PJ, Hansen HS, Kunos G, Mackie K, Mechoulam R, Ross RA (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB1 and CB2. *Pharmacol Rev* 62: 588-631.
- Pettit DA, Harrison MP, Olson JM, Spencer RF, Cabral GA (1998). Immunohistochemical localization of the neural cannabinoid receptor in rat brain. *J Neurosci Res* 51: 392-402.
- Piomelli D (2003). The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* 4:873-884.
- Pivonello R, Ferone D, Lombardi G, Colao A, Lamberts SW, Hofland LJ (2007). Novel insights in dopamine receptor physiology. *Eur J Endocrinol*. 156 Suppl 1: S13-21. Review. Erratum in: *Eur J Endocrinol*. 157: 543.
- Pollack AE, Wooten GF (1992a). Differential regulation of striatal preproenkephalin mRNA by D1 and D2 dopamine receptors. *Brain Res Mol Brain Res*. 12: 111-9.
- Pollack AE, Wooten GF (1992b). D2 dopaminergic regulation of striatal preproenkephalin mRNA levels is mediated at least in part through cholinergic interneurons. *Brain Res Mol Brain Res*. 13: 35-41.
- Pope HG Jr, Gruber AJ, Hudson JI, Huestis MA, Yurgelun-Todd D (2001). Neuropsychological performance in long-term cannabis users. *Arch Gen Psychiatry* 58:909-915.
- Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Leese AB, Felder CC (2002). Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 301:1020-1024.
- Puighermanal E, Marsicano G, Busquets-Garcia A, Lutz B, Maldonado R, Ozaita A (2009). Cannabinoid modulation of hippocampal long-term memory is mediated by mTOR signaling. *Nat Neurosci* 12:1152-1158.

- Quiroz C, Gomes C, Pak AC, Ribeiro JA, Goldberg SR, Hope BT, Ferré S (2006). Blockade of adenosine A2A receptors prevents protein phosphorylation in the striatum induced by cortical stimulation. *J Neurosci.* 26: 10808-12.
- Racz I, Nadal X, Alferink J, Baños JE, Rehnelt J, Martín M, Pintado B, Gutierrez-Adan A, Sanguino E, Manzanares J, Zimmer A, Maldonado R. Crucial role of CB(2) cannabinoid receptor in the regulation of central immune responses during neuropathic pain (2008). *J Neurosci.* 28: 12125-35.
- Ranganathan M, D'Souza DC (2006). The acute effects of cannabinoids on memory in humans: a review. *Psychopharmacology* 188: 425–444.
- Rawls SM, Cowan A, Tallarida RJ, Geller EB, Adler MW (2002). N-methyl-D-aspartate antagonists and WIN 55212-2 [4,5-dihydro-2-methyl-4(4-morpholinylmethyl)-1-(1-naphthalenyl-carbonyl)-6H-pyrrolo[3,2,1-i,j]quinolin-6-one], a cannabinoid agonist, interact to produce synergistic hypothermia. *J Pharmacol Exp Ther.* 303: 395-402.
- Redgrave P, Prescott TJ, Gurney K (1999). The basal ganglia: a vertebrate solution to the selection problem? *Neuroscience.* 89: 1009-23. Review.
- Riedel G, Davies SN (2005). Cannabinoid function in learning, memory and plasticity. *Handbook Exp Pharmacol.*: 445–477.
- Richardson, J.D, Aanonsen, L.; Hargreaves, K.M. (1998). Antihyperalgesic effects of spinal cannabinoids. *Eur. J. Pharmacol.* 345: 145-153.
- Rios C, Gomes I, Devi LA (2006).  $\mu$  opioid and CB1 cannabinoid receptor interactions: reciprocal inhibition of receptor signaling and neuriteogenesis. *Br J Pharmacol* 148: 387-395.
- Rivera A, Cuéllar B, Girón FJ, Grandy DK, de la Calle A, Moratalla R (2002a). Differential distribution of dopamine D4 receptors in the striosome/matrix compartments of the striatum. *J Neurochem* 80: 219-229.
- Rivera A, Alberti I, Narvaez J, Martín AB, de la Calle A, Moratalla R (2002b). Molecular phenotype of rat striatal neurons expressing the dopamine D5 receptor subtype. *Eur J Neurosci* 16: 2049-2058.
- Robertson HA, Peterson MR, Murphy K, Robertson GS (1989). D1-dopamine receptor agonists selectively activate striatal c-fos independent of rotational behaviour. *Brain Res.* 503: 346-9.
- Robertson GS, Vincent SR, Fibiger HC (1992). D1 and D2 dopamine receptors differentially regulate c-fos expression in striatonigral and striatopallidal neurons. *Neuroscience.* 49: 285-96.
- Robinson TE, Berridge KC (1993). The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev.* 18: 247-91. Review.
- Robinson L, Hinder L, Pertwee RG, Riedel G (2003). Effects of delta9-THC and WIN-55,212-2 on place preference in the water maze in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 166: 40-50. Epub 2002 Dec 14.

- Rodrigues TB, Granado N, Ortiz O, Cerdán S, Moratalla R (2007). Metabolic interactions between glutamatergic and dopaminergic neurotransmitter systems are mediated through D(1) dopamine receptors. *J Neurosci Res.*, 85: 3284-3293.
- Rodríguez de Fonseca F, Gorriti MA, Fernández-Ruiz JJ, Palomo T, Ramos JA (1994a). Downregulation of rat brain cannabinoid binding sites after chronic delta 9-tetrahydrocannabinol treatment. *Pharmacol Biochem Behav.* 47: 33-40.
- Rodríguez de Fonseca F, Martin Calderon JL, Mechoulam R, Navarro M (1994b). Repeated stimulation of D<sub>1</sub> dopamine receptors enhances (-)-11-hydroxy-delta-8-tetrahydrocannabinol-dimethyl-heptyl-induced catalepsy in male rats. *Neuroreport* 5: 761-5.
- Rodríguez de Fonseca F, Rubio P, Menzaghi F, Merlo-Pich E, Rivier J, Koob GF, Navarro M (1996). Corticotropin-releasing factor (CRF) antagonist [DPhe12, Nle21,38,C alpha MeLeu37]CRF attenuates the acute actions of the highly potent cannabinoid receptor agonist HU-210 on defensive-withdrawal behavior in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 276:56-64.
- Rodríguez de Fonseca , F., Carrera, M.R.A., Navarro, M., Koob, G.F., Weiss, F. (1997). Activation of corticotropin releasing factor in the limbic system during cannabinoid withdrawal. *Science.* 276, 2050-2054.
- Rodríguez de Fonseca F, Del Arco I, Martin-Calderon JL, Gorriti MA, Navarro M (1998). Role of the endogenous cannabinoid system in the regulation of motor activity. *Neurobiol Dis* 5 : 483-501.
- Rodríguez de Fonseca F, Navarro M, Gómez R, Escuredo L, Nava F, Fu J, Murillo-Rodríguez E, Giuffrida A, LoVerme J, Gaetani S, Kathuria S, Gall C, Piomelli D (2001). An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature.* 414: 209-12.
- Rodríguez de Fonseca F (2004). The endocannabinoid system and food intake control]. *Rev Med Univ Navarra.* 48: 18-23. Review.
- Rodríguez JJ, Mackie K, Pickel VM (2001). Ultrastructural localization of the CB1 cannabinoid receptor in mu-opioid receptor patches of the rat caudate putamen nucleus. *J Neurosci* 21: 823-833.
- Romero J, de Miguel R, García-Palomero E, Fernández-Ruiz JJ, Ramos JA (1995). Time-course of the effects of anandamide, the putative endogenous cannabinoid receptor ligand, on extrapyramidal function. *Brain Res.* 694: 223-32.
- Romero, J., García-Palomero, E., Fernández-Ruiz, J.J., Ramos, J.A. (1996). Involvement of GABA-B receptors in the motor inhibition produced by agonist of brain cannabinoid receptors. *Behavior Pharmacology.* 7, 299-302.
- Ronesi J, Gerdeman GL, Lovinger DM (2004) Disruption of endocannabinoid release and striatal long-term depression by postsynaptic blockade of endocannabinoid membrane transport. *J Neurosci* 24: 1673-1679
- Rossi S, De Chiara V, Musella A, Kusayanagi H, Mataluni G, Bernardi G, Usiello A, Centonze D (2008). Chronic psychoemotional stress impairs cannabinoid-receptormediated control of GABA transmission in the striatum. *J Neurosci.* 28: 7284-92.

- Routtenberg A (1972). Intracranial chemical injection and behavior: a critical review. *Behav Biol* 7: 601-641.
- Rubino T, Massi P, Patrini G, Venier I, Giagnoni G, Parolaro D (1994). Chronic CP-55,940 alters cannabinoid receptor mRNA in the rat brain: an in situ hybridization study. *Neuroreport*. 5: 2493-6.
- Rubino T, Patrini G, Massi P, Fuzio D, Viganò D, Giagnoni G, Parolaro D (1998). Cannabinoid-precipitated withdrawal: a time-course study of the behavioral aspect and its correlation with cannabinoid receptors and G protein expression. *J Pharmacol Exp Ther*. 285: 813-9.
- Rubino T, Viganò D, Massi P, Spinello M, Zagato E, Giagnoni G, Parolaro D (2000). Chronic delta-9-tetrahydrocannabinol treatment increases cAMP levels and cAMP-dependent protein kinase activity in some rat brain regions. *Neuropharmacology*. 39: 1331-6.
- Rubino T, Forlani G, Viganò D, Zippel R, Parolaro D (2004). Modulation of extracellular signal-regulated kinases cascade by chronic delta 9-tetrahydrocannabinol treatment. *Mol Cell Neurosci*. 25: 355-62.
- Saka E, Iadarola M, Fitzgerald DJ, Graybiel AM (2002). Local circuit neurons in the striatum regulate neural and behavioral responses to dopaminergic stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99: 9004-9.
- Salio C, Fischer J, Franzoni MF, Mackie K, Kaneko T, Conrath M (2001). CB1-cannabinoid and mu opioid receptor co-localization on postsynaptic target in the rat dorsal horn. *Neuroreport* 12: 3689-3692.
- Salmi P (1998). Independent roles of dopamine D1 and D2/3 receptors in rat thermoregulation. *Brain Res*. 781: 188-93.
- Salzmann J, Canestrelli C, Noble F, Marie-Claire C (2006). Analysis of transcriptional responses in the mouse dorsal striatum following acute 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy): identification of extracellular signal-regulated kinase-controlled genes. *Neuroscience*. 137: 473-82.
- Sánchez C, de Ceballos ML, del Pulgar TG, Rueda D, Corbacho C, Velasco G, Galve-Roperh I, Huffman JW, Ramon y Cajal S, Guzman M (2001). Inhibition of glioma growth in vivo by selective activation of the CB(2) cannabinoid receptor. *Cancer Res* 61: 5784-5789.
- Sánchez-Blázquez P, García-España A, Garzón J (1995). In vivo injection of antisense oligodeoxynucleotides to G alpha subunits and supraspinal analgesia evoked by mu and delta opioid agonists. *J Pharmacol Exp Ther*. 275: 1590-6.
- Santini E, Valjent E, Usiello A, Carta M, Borgkvist A, Girault JA, Hervé D, Greengard P, Fisone G. Critical involvement of cAMP/DARPP-32 and extracellular signal-regulated protein kinase signaling in L-DOPA-induced dyskinesia (2007). *J Neurosci*. 27: 6995-7005.
- Sañudo-Peña MC, Patrick SL, Patrick RL, Walker JM (1996). Effects of intranigral cannabinoids on rotational behavior in rats: interactions with the dopaminergic system. *Neurosci Lett* 206: 21-24.



- Sañudo-Peña MC, Tsou K, Delay ER, Hohman AG, Force M, Walker JM (1997). Endogenous cannabinoids as an aversive or counter-rewarding system in the rat. *Neurosci Lett*. 223: 125-8.
- Sañudo-Peña MC, Walker JM (1998). Effects of intrapallidal cannabinoids on rotational behavior in rats: interactions with the dopaminergic system. *Synapse*. 28: 27-32.
- Sañudo-Peña MC, Patrick SL, Khen S, Patrick RL, Tsou K, Walker JM (1998). Cannabinoid effects in basal ganglia in a rat model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 248: 171-174.
- Sañudo-Peña MC, Tsou K, Walker JM (1999). Motor actions of cannabinoids in the basal ganglia output nuclei. *Life Sci*. 65: 703-13. Review.
- Sañudo-Peña, M.C., Romero, J., Seale, G.E., Fernández-Ruiz, J.J., Walker, J.M. (2000). Activational role of cannabinoids on movement. *European Journal of Pharmacology*. 391, 269-74.
- Schatz, A.R., Lee, M., Condie, R.B., Pulaski, J.T., Kaminski, N.E. (1997). Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 142: 278-87.
- Schlicker, E., Kathmann, M. (2001). Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*. 22: 565-572.
- Seiden LS, Sabol KE, Ricaurte GA (1993). Amphetamine: effects on catecholamine systems and behavior. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 33: 639-77. Review.
- Self DW, Nestler EJ (1995). Molecular mechanisms of drug reinforcement and addiction. *Annu Rev Neurosci*. 18:463-95. Review.
- Shin J, Cho H, Hwang SW, Jung J, Shin CY, Lee SY, Kim SH, Lee MG, Choi YH, Kim J, Haber NA, Reichling DB, Khasar S, Levine JD, Oh U (2002). Bradykinin-12-lipoxygenase-VR1 signaling pathway for inflammatory hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99: 10150-5.
- Sim LJ, Hampson RE, Deadwyler SA, Childers SR (1996). Effects of chronic treatment with delta9-tetrahydrocannabinol on cannabinoid-stimulated [35S]GTPgammaS autoradiography in rat brain. *J Neurosci*. 16: 8057-66.
- Skaper SD, Buriani A, Dal Toso R, Petrelli L, Romanello S, Facci L, Leon A (1996). The ALIAmide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 3984-3989.
- Smirnov MS, Kiyatkin EA (2008). Behavioral and temperature effects of delta 9-tetrahydrocannabinol in human-relevant doses in rats. *Brain Res*. 1228: 145-60.
- Smith AD, Bolam JP (1990). The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurones. *Trends Neurosci*. 13: 259-65. Review.
- Smith PB., Welch SP, Martin BR (1994). Interaction between  $\Delta^9$ - tetrahydrocannabinol and kappa opioids in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 268: 1382-1387.

- Smith Y, Bevan MD, Shink E, Bolam JP (1998). Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience*. 86: 353-87. Review.
- Solinas M, Justinová Z, Goldberg SR, Tanda G (2006). Anandamide administration alone and after inhibition of fatty acid amide hydrolase (FAAH) increases dopamine levels in the nucleus accumbens shell in rats. *J Neurochem* 98: 408-419.
- Solinas M, Tanda G, Wertheim CE, Goldberg SR (2010). Dopaminergic augmentation of delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) discrimination: possible involvement of D(2)-induced formation of anandamide. *Psychopharmacology (Berl)* 209: 191-202.
- Steiner H, Gerfen CR (1993). Cocaine-induced c-fos messenger RNA is inversely related to dynorphin expression in striatum. *J Neurosci*. 13: 5066-81.
- Steiner H, Gerfen CR (1995). Dynorphin opioid inhibition of cocaine-induced, D1 dopamine receptor-mediated immediate-early gene expression in the striatum. *J Comp Neurol*. 353: 200-12.
- Steketee JD, Kalivas PW (2011). Drug wanting: behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior. *Pharmacol. Rev.* 63: 348-365.
- Stella, N., Schweitzer, P., Piomelli, D. (1997). A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*. 388, 773-778.
- Stella N (2010). Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas. *Glia* 58: 1017-1030.
- Stewart JL, McMahon LR (2010). Rimonabant-induced Delta9-tetrahydrocannabinol withdrawal in rhesus monkeys: discriminative stimulus effects and other withdrawal signs. *J Pharmacol Exp Ther* 334: 347-356.
- Suárez J, Ortiz O, Puente N, Bermúdez-Silva FJ, Blanco E, Fernández-Llebrez P, Grandes P, de Fonseca FR, Moratalla R (2011). Distribution of diacylglycerol lipase alpha, an endocannabinoid synthesizing enzyme, in the rat forebrain. *Neuroscience*. 192: 112-31.
- Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A., Waku, K. (1995). 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 215: 89-97.
- Sugiura, T., Kondo, S., Kishimoto, S., Miyashita, T., Nakane, S., Kodaka, T., Suhara, Y., Takayama, H., Waku, K. (2000). Evidence that 2-arachidonoylglycerol but not Npalmitoylethanolamine or anandamide is the physiological ligand for the cannabinoid CB2 receptor. Comparison of the agonistic activities of various cannabinoid receptor ligands in HL-60 cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 275, 605-12.
- Sugiura T, Kobayashi Y, Oka S, Waku K (2002). Biosynthesis and degradation of anandamide and 2-arachidonoylglycerol and their possible physiological significance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66: 173-192.
- Sugiura T, Kishimoto S, Oka S, Gokoh M (2006). Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Prog Lipid Res* 45: 405-446.

- Sunahara RK, Niznik HB, Weiner DM, Stormann TM, Brann MR, Kennedy JL, Gelernter JE, Rozmahel R, Yang YL, Israel Y, et al (1990). Human dopamine D1 receptor encoded by an intronless gene on chromosome 5. *Nature*. 347: 80-3.
- Szabo B, Dorner L, Pfreundtner C, Norenberg W, Starke K (1998). Inhibition of GABAergic inhibitory postsynaptic currents by cannabinoids in rat corpus striatum. *Neuroscience* 85: 395- 403.
- Szabo B, Wallmichrath I, Mathonia P, Pfreundtner C (2000). Cannabinoids inhibit excitatory neurotransmission in the substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience*. 2000; 97: 89-97.
- Szabo B, Schlicker E (2005). Effects of cannabinoids on neurotransmission. *Handb Exp Pharmacol* 168: 327-365.
- Tanda G, Pontieri FE, Di Chiara G (1997). Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common mu1 opioid receptor mechanism. *Science*. 276: 2048-50.
- Tepper JM, Koós T, Wilson CJ (2004). GABAergic microcircuits in the neostriatum. *Trends Neurosci*. 27: 662-9. Review.
- Tepper JM, Bolam JP (2004). Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Curr Opin Neurobiol*. 14: 685-92. Review.
- Trigo JM, Martín-García E, Berrendero F, Robledo P, Maldonado R (2010). The endogenous opioid system: a common substrate in drug addiction. *Drug Alcohol Depend* 108: 183-194.
- Tsou K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K, Walker JM (1998). Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 83: 393-411.
- Tzavara ET, Li DL, Moutsimilli L, Bisogno T, Di Marzo V, Phebus LA, Nomikos GG, Giros B (2006). Endocannabinoids activate transient receptor potential vanilloid 1 receptors to reduce hyperdopaminergic-related hyperactivity: Therapeutic implications. *Biol Psychiatry* 59: 508–515.
- Usiello A, Baik JH, Rougé-Pont F, Picetti R, Dierich A, LeMeur M, Piazza PV, Borrelli E (2000). Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature*. 408: 199-203.
- Uslaner J, Badiani A, Day HE, Watson SJ, Akil H, Robinson TE (2001). Environmental context modulates the ability of cocaine and amphetamine to induce c-fos mRNA expression in the neocortex, caudate nucleus, and nucleus accumbens. *Brain Res*. 920: 106-16.
- Valjent E, Maldonado R (2000). A behavioural model to reveal place preference to delta 9-tetrahydrocannabinol in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 147: 436-8.
- Valjent E, Corvol JC, Pages C, Besson MJ, Maldonado R, Caboche J (2000). Involvement of the extracellular signal-regulated kinase cascade for cocaine-rewarding properties. *J Neurosci*. 2000 20: 8701-9.

- Valjent E, Pages C, Rogard M, Besson MJ, Maldonado R, Caboche J (2001). Delta 9-tetrahydrocannabinol-induced MAPK/ERK and Elk-1 activation in vivo depends on dopaminergic transmission. *Eur J Neurosci* 14: 342-352.
- Valjent E, Mitchell JM, Besson MJ, Caboche J, Maldonado R (2002). Behavioural and biochemical evidence for interactions between Delta 9-tetrahydrocannabinol and nicotine. *Br J Pharmacol*. 135: 564-78.
- Valjent E, Pagès C, Hervé D, Girault JA, Caboche J (2004). Addictive and non-addictive drugs induce distinct and specific patterns of ERK activation in mouse brain. *Eur J Neurosci*. 2004 19(7): 1826-36.
- Valjent E, Pascoli V, Svenningsson P, Paul S, Enslen H, Corvol JC, Stipanovich A, Caboche J, Lombroso PJ, Nairn AC, Greengard P, Hervé D, Girault JA (2005). Regulation of a protein phosphatase cascade allows convergent dopamine and glutamate signals to activate ERK in the striatum. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102: 491-6.
- Vallone D, Pellicchia MT, Morelli M, Verde P, DiChiara G, Barone P (1997). Behavioural sensitization in 6-hydroxydopamine-lesioned rats is related to compositional changes of the AP-1 transcription factor: evidence for induction of FosB- and JunD-related proteins. *Brain Res Mol Brain Res*. 52: 307-17.
- Vallone D, Picetti R, Borrelli E (2000). Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev*. Jan 24: 125-32. Review.
- Valverde O, Maldonado R, Valjent E, Zimmer AM, Zimmer A (2000). Cannabinoid withdrawal syndrome is reduced in pre-proenkephalin knock-out mice. *J Neurosci*. 20: 9284-9.
- Vanderschuren LJ, Schoffelmeer AN, Van Leeuwen SD, Hof L, Jonker AJ, Voorn P (2002). Compartment-specific changes in striatal neuronal activity during expression of amphetamine sensitization are the result of drug hypersensitivity. *Eur J Neurosci*. 16: 2462-8.
- Van der Stelt M, Di Marzo V (2003). The endocannabinoid system in the basal ganglia and in the mesolimbic reward system: implications for neurological and psychiatric disorders. *Eur J Pharmacol*. 480: 133-50. Review.
- Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, Stella N, Makriyannis A, Piomelli D, Davison JS, Marnett LJ, Di Marzo V, Pittman QJ, Patel KD, Sharkey KA (2005). Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* 310: 329-332.
- Varvel SA, Bridgen DT, Tao Q, Thomas BF, Martin BR, Lichtman AH (2005). Delta9-tetrahydrocannabinol accounts for the antinociceptive, hypothermic, and cataleptic effects of marijuana in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 314: 329-37. Epub 2005 Apr 14.
- Vaughan CW, Christie MJ (2005). Retrograde signalling by endocannabinoids. *Handb Exp Pharmacol* 168: 367-383.
- Vogel, Z., Barg, L., Levy, R., Saya, D., Heldman, E., Mechoulam, R. (1993). Anandamide, a brain endogenous compound, interacts specifically with cannabinoid receptors and inhibits adenylyl cyclase. *Journal of Neurochemistry*. 61: 352-5.

- Walker JM, Huang SM, Strangman NM, Tsou K, Sanudo-Pena MC (1999). Pain modulation by release of the endogenous cannabinoid anandamide. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 12198-12203.
- Walker JM, Huang SM (2002). Cannabinoid analgesia. *Pharmacol Ther* 95:127–135.
- Walter L, Franklin A, Witting A, Wade C, Xie Y, Kunos G, Mackie K, Stella N (2003). Nonpsychoactive cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J Neurosci* 23: 1398-1405.
- Wang JQ, McGinty JF (1996). D1 and D2 receptor regulation of preproenkephalin and preprodynorphin mRNA in rat striatum following acute injection of amphetamine or methamphetamine. *Synapse* 22: 114-22.
- Wegener N, Kuhnert S, Thuns A, Roese R, Koch M (2008). Effects of acute systemic and intracerebral stimulation of cannabinoid receptors on sensorimotor gating, locomotion and spatial memory in rats. *Psychopharmacology* 198: 375–385.
- Weiner DM, Levey AI, Sunahara RK, Niznik HB, O'Dowd BF, Seeman P, and Brann MR (1991). D1 and D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 88: 1859-1863.
- Westin JE, Vercammen L, Strome EM, Konradi C, Cenci MA (2007). Spatiotemporal pattern of striatal ERK1/2 phosphorylation in a rat model of L-DOPA-induced dyskinesia and the role of dopamine D1 receptors. *Biol Psychiatry*. 62: 800-10.
- Westlake, T.M., Howlett, A.C., Bonner, T.I., Matsuda, L.A., Herkenham, M. (1994). Cannabinoid receptor binding and messenger RNA expression in human brain: an in vitro receptor autoradiography and in situ hybridization histochemistry study of normal aged and Alzheimer's brains. *Neuroscience*. 63: 637-52.
- Williams CM., Kirkham TC (2002). Reversal of delta 9-THC hyperphagia by SR141716 and naloxone but not dexfenfluramine. *Pharmacol Biochem Behav.*; 71: 333-340.
- Wilson CJ, Chang HT, Kitai ST (1990). Firing patterns and synaptic potentials of identified giant aspiny interneurons in the rat neostriatum. *J Neurosci*. 10: 508-19.
- Wilson RI, Nicoll RA (2002). Endocannabinoid signaling in the brain. *Science* 296: 678-682.
- Wise RA (1996). Neurobiology of addiction. *Curr Opin Neurobiol*. 2: 243-51. Review.
- Wise SP, Murray EA, Gerfen CR (1996). The frontal cortex-basal ganglia system in primates. *Crit Rev Neurobiol*. 10: 317-56. Review.
- Wise LE, Thorpe AJ, Lichtman AH (2009). Hippocampal CB(1) receptors mediate the memory impairing effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Neuropsychopharmacology*. Aug;34: 2072-80.
- White NM, Hiroi N (1998). Preferential localization of self-stimulation sites in striosomes/patches in the rat striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95: 6486-91.

- Wright JM, Peoples RW, Weight FF (1996). Single-channel and whole-cell analysis of ethanol inhibition of NMDA-activated currents in cultured mouse cortical and hippocampal neurons. *Brain Res.* 738: 249-56.
- Young AM, Katz JL, Woods JH (1981). Behavioral effects of levonantradol and nantradol in the rhesus monkey. *J Clin Pharmacol* 21: 348S-360S.
- Young ST, Porrino LJ, Iadarola MJ (1991). Cocaine induces striatal c-fos-immunoreactive proteins via dopaminergic D1 receptors. *Proc Natl Acad Sci* 88: 1291-5.
- Xu M, Moratalla R, Gold LH, Hiroi N, Koob GF, Graybiel AM, Tonegawa S (1994). Dopamine D1 receptor mutant mice are deficient in striatal expression of dynorphin and in dopamine-mediated behavioural responses. *Cell* 79(4):729-42.
- Xu M, Koeltzow TE, Santiago GT, Moratalla R, Cooper DC, Hu XT, White NM, Graybiel AM, White FJ, Tonegawa S (1997). Dopamine D3 receptor mutant mice exhibit increased behavioral sensitivity to concurrent stimulation of D1 and D2 receptors. *Neuron.* 19: 837-48.
- Xu M (2008). c-Fos is an intracellular regulator of cocaine-induced long-term changes. *Ann N Y Acad Sci.* 1139: 1-9.
- Záborszky L, Alheid GF, Beinfeld MC, Eiden LE, Heimer L, Palkovits M (1985). Cholecystokinin innervation of the ventral striatum: a morphological and radioimmunological study. *Neuroscience.* 14: 427-53.
- Zangen A, Solinas M, Ikemoto S, Goldberg SR, Wise RA, (2006). Two brain sites for cannabinoid reward. *J Neurosci* 26: 4901-4907.
- Zhang D, Zhang L, Lou DW, Nakabeppu Y, Zhang J, Xu M (2002). The dopamine D1 receptor is a critical mediator for cocaine-induced gene expression. *J Neurochem.* 82: 1453-64.
- Zhang J, Zhang L, Jiao H, Zhang Q, Zhang D, Lou D, Katz JL, Xu M (2006). c-Fos facilitates the acquisition and extinction of cocaine-induced persistent changes. *J Neurosci* 26: 13287-96.
- Zhuang S, Kittler J, Grigorenko EV, Kirby MT, Sim LJ, Hampson RE, Childers SR, Deadwyler SA (1998). Effects of long-term exposure to delta9-THC on expression of cannabinoid receptor (CB1) mRNA in different rat brain regions. *Brain Res Mol Brain Res.* 62: 141-9.
- Zimmer A, Zimmer AM, Hohmann AG, Herkenham M, Bonner TI (1999). Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 5780-5785.
- Zimmer A, Valjent E, König M, Zimmer AM, Robledo P, Hahn H, Valverde O, Maldonado R (2001). Absence of delta -9-tetrahydrocannabinol dysphoric effects in dynorphin-deficient mice. *J Neurosci.* 21: 9499-505.



## ***SUMMARY***





## **INTRODUCTION**

Cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors are expressed in brain areas that contribute to movement such as the basal ganglia. The highest concentration of CB<sub>1</sub> receptors is found in the striatum, where they colocalize with dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors in striatal neurons (Herkenham et al, 1990, 1991a; Tsou et al, 1998; Hermann et al, 2002; Julian et al, 2003). However, their regional and neuronal distribution has not been established. It is known that there is a continuous release of endogenous cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor agonists such as anandamide in the brain, and that these endogenous agonists exhibit neurotransmitter function. The endocannabinoid system can act as a modulator of dopaminergic neurotransmission in the basal ganglia (Cadogan et al, 1997; Glass and Felder, 1997; Giuffrida et al, 1999; Beltramo et al, 2000; Gerdeman and Lovinger, 2001; Gubellini et al, 2002). Endogenous cannabinoids have been proposed to act in a homeostatic mechanism in the basal ganglia by activating CB<sub>1</sub> receptors, which appear to function as a brake on dopaminergic function in the striatum (Rodriguez de Fonseca et al, 1994b, 1998).

Determining the functional interaction between CB<sub>1</sub> and D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors in the striatum is important for understanding neurochemical changes in diseases such as parkinsonism and schizophrenia and in adaptive processes including the rewarding effects of drugs of abuse. Dopamine receptor agonists and antagonists are currently used therapeutically for these disorders and there is emerging evidence that CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor antagonists have a therapeutic effect in some of these disorders as well (Fernandez-Espejo et al, 2005; Sañudo-Peña et al, 1998).

The critical role of dopaminergic transmission in psychostimulant-induced behavioral sensitization has been inferred from evidence that psychostimulants enhance the level of dopamine in the synapse either by increasing presynaptic dopamine release (amphetamine) or blocking dopamine reuptake (cocaine) (Koob, 1992; Self and Nestler, 1995). Chronic exposure to psychostimulants produces changes prolonged in the behavior, behavioral sensitization and addiction developing tolerance and dependence (Robinson and Berridge, 1993; Moratalla et al, 1996a). The enduring nature of drug addiction suggests that repeated exposure to drugs leads to stable alterations that involve persistent changes in neuronal circuits, cell signaling and gene expression (Robertson et

al, 1989; Graybiel et al, 1990; Berke et al, 1998; Drago et al, 1996; Moratalla et al, 1996a; Zhang et al, 2006, Canales and Graybiel, 2000 a,b).

## **OBJECTIVES**

The aim of this doctoral thesis was to clarify the participation of the dopaminergic system in the actions of cannabinoids and psychostimulants, adopting a molecular, biochemical, anatomical and behavioural approach.

This hypothesis is based on the existence of evidence indicating that the dopaminergic system interacts with the cannabinoid system through its primary D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors, and that this interaction is important in the behavioural responses mediated by these receptors, in the actions of cannabinoids and in the development of addiction. In addition, the importance of the inactivation of the D<sub>2</sub> receptor in the actions of psychostimulants was evaluated.

The specific objectives of this doctoral thesis were:

- To determine the anatomical substrate of the interaction between the dopaminergic and cannabinoid system at the cellular level.
- To define how the expression of the CB<sub>1</sub> receptor is modulated by the dopaminergic system in mice lacking the D<sub>1</sub> or D<sub>2</sub> receptors.
- To determine the functional role by the endogenous cannabinoid system in behavioral responses mediated by the D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> dopaminergic receptors, evaluating rotational behaviour, grooming and stereotypies in rats and D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> mice.
- To determine the role of the D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors in the actions mediated by cannabinoids at the behavioural level in KO mice (D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> and D<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>) and their corresponding WT controls, evaluating: aspects of addiction, motor behaviour, analgesic and thermal responses to the THC cannabinoid agonist.
- To determine the impact of the inactivation of the D<sub>2</sub> receptor on the actions of the psychostimulants, amphetamines and cocaine, and of the D<sub>1</sub> dopaminergic agonist, SKF 81297, evaluating motor activity and the induction of transcription factor and peptide expression after the administration of these compounds.

## RESULTS

In this study we have established that the CB<sub>1</sub> receptor is widely distributed in the CNS and in particular, that it concentrates in the basal ganglia and in the limbic system, both structures that are innervated by the dopaminergic system and that control movement and emotions, as well as being implicated in addiction. In this study we demonstrate that the CB<sub>1</sub> receptor co-localizes with the D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors in striatal GABAergic neurons of the direct and indirect striatal pathway. In addition, we show that the expression of the CB<sub>1</sub> receptor is not dependent on inactivation of the D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> dopaminergic receptors. Endogenous cannabinoids act through CB<sub>1</sub> receptors to inhibit the motor behaviour mediated by dopamine, which includes behaviours such as the grooming mediated by the D<sub>1</sub> receptor, the rotations induced by the D<sub>1</sub> receptor, as well as the oral stereotypies caused by the D<sub>2</sub> receptor. As such, these compounds play an important role in the regulation of the motor circuits in the basal ganglia.

Accordingly, these results have important therapeutic implications, given that oral stereotypies are a secondary effect of prolonged dopaminergic manipulation in humans, as is the case of treatments with neuroleptic agents to treat psychosis and L-dopa therapy for Parkinson's Disease. Our results suggest that the CB<sub>1</sub> agonists could have potential therapeutic benefits to reduce the incidence of these abnormal oral responses, without affecting the beneficial effects of L-dopa on the D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors.

The comparative anatomical studies of  $\mu$ -opiod receptor binding and *in situ* hybridisation support the results already obtained, and which had demonstrated the existence of an interaction between the cerebral cannabinoid and opiod motivational systems implicated in the drug dependence, in analgesia and in tolerance-dependence phenomena.

In this study, we evaluated the role of the D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> dopaminergic receptors in the motivational and physiological responses induced by THC, using mice that lack these receptors. The impact of the inactivation of these receptors was evaluated in the analgesia, hypothermia, motor activity, motivational effects and abstinence associated with THC.

Treatment with cannabinoid agonists affects how the endogenous cannabinoid system modulates the control and regulation of motor behaviour. Our results

demonstrate that the D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> dopaminergic receptors are implicated in the motor response to THC, and that only the D<sub>1</sub> receptor is implicated in the analgesic effect and in the reduction in temperature. Furthermore, the data demonstrate that only the D<sub>2</sub> receptor intervenes in the development of tolerance to the motor effects induced by chronic treatment with THC.

Due to the particular relevance of the D<sub>2</sub> dopaminergic receptors in the reinforcement effects of some drugs, the influence of this receptor on the motivational effects induced by THC was evaluated. The results obtained demonstrate that the D<sub>2</sub> receptor is not implicated in such effects but rather, that it is important for the manifestation of all the somatic symptoms of abstinence.

Accordingly, these results establish that the dopaminergic system modulates certain actions of cannabinoids, and that the manipulation of the D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors will provide us with new pharmacological targets that will help to address novel therapeutic challenges.

The studies carried out in this doctoral thesis have provided solid evidence that the D<sub>2</sub> dopaminergic receptor fulfils an essential role in behavioural sensitization (an indirect measure of addiction) induced by psychostimulants. In addition, the results obtained also demonstrate that the integrity of the D<sub>2</sub> receptor must be maintained for the basal expression of the neuropeptide dynorphin to persist, or for its expression to be induced by cocaine or amphetamines. Moreover, our data show that the inactivation of the D<sub>2</sub> receptor reduces the induction of early response genes, such as c-fos expression, and the phosphorylation of ERK induced by cocaine and amphetamines. Previous research showed that the dopaminergic D<sub>1</sub> receptor is one of the principal receptors implicated in the behavioural, cellular and molecular changes induced by the administration of cocaine, and through these results presented here, we establish that the D<sub>2</sub> dopaminergic receptor fulfils a very important role given that it facilitates the actions mediated by the D<sub>1</sub> dopaminergic receptor.

## **CONCLUSIONS**

1. In the basal ganglia, the CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor is synthesized in the projection neurons of striatum, and it is expressed in the globus pallidus and in the substantia nigra.
2. Acting through the striatal CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor, endogenous cannabinoids play an important role in the regulation of the motor circuits of the basal ganglia.
3. The D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> dopaminergic receptors modulate the actions of cannabinoids.
4. The D<sub>2</sub> dopaminergic receptor facilitates the actions mediated by the D<sub>1</sub> receptor under basal conditions, as well as following exposure to cocaine or amphetamines.



***ANEXO***





# NEUROANATOMICAL RELATIONSHIP BETWEEN TYPE 1 CANNABINOID RECEPTORS AND DOPAMINERGIC SYSTEMS IN THE RAT BASAL GANGLIA

M. D. JULIAN,<sup>a\*</sup> A. B. MARTIN,<sup>a</sup> B. CUELLAR,<sup>a</sup> F. RODRIGUEZ DE FONSECA,<sup>b</sup> M. NAVARRO,<sup>c</sup> R. MORATALLA<sup>a1</sup> AND L. M. GARCIA-SEGURA<sup>a1</sup>

<sup>a</sup>Instituto Cajal C.S.I.C., Dr. Arce 37, 28002 Madrid, Spain

<sup>b</sup>Unidad de Investigacion, Fundacion Hospital Carlos Haya, Malaga, Spain

<sup>c</sup>Departamento de Psicobiologia, Facultad de Psicologia, Universidad Complutense, Madrid, Spain

**Abstract**—Dopamine and endocannabinoids are neurotransmitters known to play a role in the activity of the basal ganglia motor circuit. While a number of studies have demonstrated functional interactions between type 1 cannabinoid (CB1) receptors and dopaminergic systems, we still lack detailed neuroanatomical evidence to explain their relationship. Single- and double-labeling methods (*in situ* hybridization and immunohistochemistry) were employed to determine both the expression and localization of CB1 receptors and tyrosine hydroxylase (TH) in the basal ganglia. In the striatum, we found an intense signal for CB1 receptor transcripts but low signal for CB1 receptor protein, whereas in the globus pallidus and substantia nigra we found the opposite; no hybridization signal but intense immunoreactivity. Consequently, CB1 receptors are synthesized in the striatum and mostly transported to its target areas. No co-expression or co-localization of CB1 receptors and TH was found. In the caudate-putamen, globus pallidus and substantia nigra, TH-immunoreactive fibers were interwoven with the CB1 receptor-immunoreactive neuropil and fibers. Our data suggest that the majority of the striatal CB1 receptors are located presynaptically on inhibitory GABAergic terminals, in a position to modulate neurotransmitter release and influence the activity of substantia nigra dopaminergic neurons. In turn, afferent dopaminergic fibers from the substantia nigra innervate CB1 receptor-expressing striatal neurons that are known to also express dopamine receptors. In conclusion, these data provide a neuroanatomical basis to explain functional interactions between endocannabinoid and dopaminergic systems in the basal ganglia. © 2003 IBRO. Published by

Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

**Key words:** endocannabinoids, dopamine, tyrosine hydroxylase, striatum, globus pallidus, substantia nigra.

The central cannabinoid system exerts its physiological actions mainly through type 1 cannabinoid (CB1) receptors. Endogenous (anandamide and 2-arachidonoyl glycerol) or exogenous cannabinoid ligands activate CB1 receptors to influence a broad range of functions, including learning, memory, cognition, pain perception, appetite, mood, endocrine regulation and motor activity (for review see Breivogel and Childers, 1998). CB1 receptors are expressed throughout the brain, located on structures involved in the physiological regulation of these functions (Herkenham et al., 1991a,b; Mailleux and Vanderhaeghen, 1992; Pettit et al., 1998). A particular enrichment of CB1 receptors has been found in the basal ganglia, a forebrain system that integrates cortical information to coordinate signals that regulate motor activity. The motor function of the basal ganglia comprises both the coding of motor sequences and the organization of natural behaviors (Aldridge and Berridge, 1998). It is well known that CB1 receptors in the basal ganglia participate in the regulation of coordinated motor behaviors (Rodriguez de Fonseca et al., 1998). Cannabinoid receptor agonists characteristically induce hyperactivity at low doses and depression of motor activity and catalepsy at high doses (Chaperon and Thiebot, 1999). In addition, the basal ganglia are involved in neurodegenerative disorders such as Parkinson's and Huntington's diseases (Graybiel, 1996; Gerfen, 2000) and changes in basal ganglia CB1 receptor expression or endocannabinoid levels have been described in rat models of Parkinson's disease (Di Marzo et al., 2000; Silverdale et al., 2001).

Molecular cloning of rat CB1 receptor (Matsuda et al., 1990) stimulated the study of the neurobiology of the endogenous cannabinoid system. Using CB1 receptor cDNA probes, together with agonists, antagonists and antibodies against the CB1 receptor, abundant neuroanatomical and functional findings have been reported. These studies employed diverse approaches such as ligand binding autoradiography (Herkenham et al., 1991a,b; Mailleux and Vanderhaeghen, 1992), *in situ* hybridization (Mailleux and Vanderhaeghen, 1993; Matsuda et al., 1993; Westlake et al., 1994), immunohistochemistry (Tsou et al., 1998; Pettit et al., 1998), electrophysiology (Gerdeman and Lovinger, 2001; Gerdeman et al., 2002) and behavior (Romero et al., 1995; Souilhac et al., 1995; Chaperon and Thiebot, 1999). However, CB1 receptor mechanisms of action appear to

<sup>1</sup> R. Moratalla and L. M. Garcia-Segura contributed equally to this study.

\*Corresponding author. Tel: +34-91-585-4729; fax: +34-91-585-4754.

E-mail address: djulian@cajal.csic.es (M. D. Julian).

**Abbreviations:** b.w., body weight; CART, cocaine and amphetamine regulated transcript; CB1 receptors, type 1 cannabinoid receptors; CPu, caudate putamen; D1, dopamine receptor type 1; D2, dopamine receptor type 2; DAB, 3,3'-diaminobenzidine; DAB-Ni, DAB intensified with nickel sulfate; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; ERK, extracellular signal-regulated kinase; GP, globus pallidus; PB, phosphate buffer; PBS, phosphate buffered saline; PBST, phosphate buffer containing Triton X-100 and bovine serum albumin; SN, substantia nigra; SNc, pars compacta of substantia nigra; SNr, pars reticulata of substantia nigra; SSC, saline sodium citrate; TH, tyrosine hydroxylase; THC,  $\Delta$ -9-tetrahydrocannabinol.

be complex and are not completely understood. Some of their known molecular effects include G protein-mediated inhibition of adenylyl cyclase, blockade of voltage-dependent calcium channels and activation of voltage-dependent potassium channels (Howlett, 1998).

It is known that cannabinoids affect neurotransmitter release via presynaptic CB1 receptors (Miller and Walker, 1995; Chan et al., 1998; Szabo et al., 1998; Gerdeman and Lovinger, 2001; Huang et al., 2001; Schlicker and Kathmann, 2001). Therefore, one potential mechanism by which cannabinoids may influence substantia nigra (SN) dopaminergic neurons is via presynaptic CB1 receptors located on GABAergic terminals. However, the molecular mechanisms of the interactions between the cannabinoid and dopaminergic systems have not been precisely clarified. Moreover, the reported interactions between these two systems with respect to the striatal afferent pathways are still controversial. Some studies have shown an increase in dopamine turnover and release after cannabinoid receptor stimulation in the striatum, whereas others have shown no effect (Romero et al., 1995; Gardner and Vorel, 1998; Szabo et al., 1999; Schlicker and Kathmann, 2001). Studies on the effect of dopamine receptor blockade or dopamine denervation revealed increased CB1 receptor mRNA expression in the rat striatum (Mailleux and Vanderhaeghen, 1993; Zeng et al., 1999; Romero et al., 2000). Paradoxically, these higher levels of CB1 receptor mRNA expression were not accompanied by any significant changes in CB1 receptor binding, measured by [<sup>3</sup>H]WIN-55,212,2 autoradiography, or by activation of signal transduction mechanisms by WIN-55,212,2-stimulated [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S binding autoradiography (Romero et al., 2000). Moreover, other findings have revealed mutual interactions between anandamide and the dopamine D2 receptor (Giuffrida et al., 1999; Beltramo et al., 2000). In these *in vivo* studies, stimulation of dopamine D2 receptor located in the striatum triggers the release of anandamide. In turn, the released endocannabinoid inhibits the facilitatory role on movement derived from dopamine D2 receptor stimulation. The location of dopamine D2 receptor in both postsynaptic striatal neurons and presynaptic nigrostriatal dopaminergic terminals (Mottola et al., 2002; Wu et al., 2002), where they serve as functional autoreceptors regulating dopamine release, makes it difficult to identify the level of interaction with the CB1 receptor.

To investigate the neuroanatomical relationships between the cannabinoid and dopaminergic systems, we have performed single- and double-labeling techniques (*in situ* hybridization and immunohistochemistry) of CB1 receptors and tyrosine hydroxylase (TH; the rate-limiting enzyme for dopamine synthesis). These data provide a detailed mapping of the distribution of their mRNA (site of synthesis) and protein (site of action).

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Animals

This study was carried out on inbred adult (2–3 months old, 250–300 g body weight [b.w.]) male Wistar rats. Rats received

food and water *ad libitum* and were kept in a 12-h light/dark cycle. The maintenance of the animals as well as the experimental procedures followed the guidelines from the European Union (Council Directive 86/609/EEC). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

### Tissue preparation for *in situ* hybridization

Rats were killed by rapid decapitation and their brains were removed and quickly frozen in powdered dry ice. Coronal sections (12  $\mu$ m thick) were cut in a cryostat and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use.

### Riboprobe synthesis and labeling

We have used a 1619 bp <sup>35</sup>S-labeled cRNA probe, complementary to the human CB1 receptor and a 250 bp digoxigenin-labeled cRNA probe complementary to rat TH. Labeled riboprobes were transcribed from a CB1 receptor cDNA plasmid provided by Dr. A. Santos, Universidad Complutense, Madrid, Spain, and from a TH cDNA plasmid provided by Dr. J. Mallet, Hopital de la Pitie Salpetriere, Paris, France.

The radioactive cRNA probe for CB1 receptor was synthesized with a Promega labeling reaction kit (Madison, WI, USA), with T3 polymerase to generate the antisense and with T7 to generate the sense probe. As in Moratalla et al. (1993), 1  $\mu$ g of the appropriate template was reacted with 350  $\mu$ Ci of a <sup>35</sup>S-CTP (1000 Ci/mmol, DuPont, NEN, Boston, MA, USA), together with 50  $\mu$ M of a mix of unlabeled CTP, ATP, GTP and UTP. Digoxigenin-labeled riboprobe for TH was generated similarly but using 2  $\mu$ l of the Dig RNA Labeling Mix (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) containing digoxigenin-11-UTP, and unlabeled CTP, ATP, GTP, and UTP, following manufacturers' instructions. Riboprobes were purified by ethanol precipitation, resuspended in TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.6) with 40 units of RNasin (an RNase inhibitor provided with the kit) and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until used.

### *In situ* hybridization

For *in situ* hybridization, selected sections were thawed, dried under a cold jet of air, fixed for 10 min in 4% paraformaldehyde and rinsed three times (5 min each) in 0.1 M phosphate buffer containing 0.9% NaCl, pH 7.4 (phosphate buffered saline [PBS]). Sections were then acetylated for 10 min with 0.25% acetic anhydride in 0.1 M triethanolamine (pH 8.0), rinsed three times in PBS, dehydrated in graded series of ethanol, and defatted in chloroform.

<sup>35</sup>S-labeled CB1 receptor riboprobe (alone or in combination with digoxigenin-labeled TH riboprobe) was mixed in a hybridization solution, applied to sections and hybridized for 4 h at  $60^{\circ}\text{C}$  in a humid chamber. Radioactively labeled probes were diluted in the hybridization solution to achieve a concentration of 104 cpm/ $\mu$ l, while digoxigenin-labeled probes were diluted 1:100 in the hybridization solution. Total volume of the hybridization buffer was 90  $\mu$ l for each section. After hybridization, slides were rinsed in 2 $\times$  SSC (saline sodium citrate) solution (0.15 M NaCl, 15 mM sodium citrate) and then in 0.1 $\times$  SSC at  $70^{\circ}\text{C}$  for 30 min. Slides were subsequently treated with RNase A, for 30 min at  $37^{\circ}\text{C}$ , rinsed for 15 min at room temperature and washed twice for 30 min in 0.1 $\times$  SSC at  $70^{\circ}\text{C}$ . For single radioactive *in situ* hybridization, slides were then dehydrated in 70% and 95% ethanol for 2 min each, after which they were dried overnight at room temperature. The following day, slides were placed in cassettes and exposed to Hyperfilm  $\beta$ Max (Amersham Pharmacia Biotech, Barcelona, Spain) for 3–5 days. Films were subsequently developed in D19 (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA), and analyzed with an image analysis system. For dual *in situ* hybridization, slides were processed to detect the second mRNA labeled with digoxigenin. Slides were rinsed in 100 mM Tris-HCl (pH 7.5) containing 0.9%

NaCl and incubated for 5 h at room temperature with an alkaline phosphatase-conjugated polyclonal anti-digoxigenin antiserum raised in rabbit (Roche Molecular Biochemicals), diluted 1:2000. Sections were then washed three times in PBS, incubated in the dark with the alkaline phosphatase substrate, nitroblue tetrazolium (0.34 mg/ml), and bromo-chloro-indolyl-phosphate (0.18 mg/ml) in 100 mM Tris-HCl buffer containing 100 mM NaCl and 50 mM  $MgCl_2$  (pH 9.5). Reaction progress was monitored every 2 h under high magnification for the development of color. The completed reaction was stopped in 100 mM Tris HCl, 50 mM EDTA, and 0.9% NaCl. Slides were rinsed in water, immersed in 70% ethanol for 2 min, and dried. After exposure to Hyperfilm  $\beta$ Max, selected slides were dipped in nuclear track emulsion LM1 (Eastman Kodak) diluted 1:1 in 0.1% glycerol dissolved in distilled water. Sections were dried at room temperature and stored in the dark with desiccant at 4 °C for 4–6 weeks. Slides were developed in D19, counterstained with Thionin, and coverslipped.

### Tissue preparation for immunohistochemistry

Animals were anesthetized by an i.p. administration of pentobarbital and perfused by means of a cannula introduced into the ascending aorta through the left ventricle. The vascular network was first washed of blood with saline solution (0.9% NaCl), followed by fixation with 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (PB, 0.1 M, pH 7.4). The brains were then extracted and postfixed by immersion in the same fixative for 12–24 h at 4 °C. Thereafter they were washed in two to three changes of PB 0.1 M and then cut with a vibrating blade microtome into 50  $\mu$ m-thick coronal serial sections.

Single- and double-labeling immunohistochemical techniques were employed for the detection of the antigens in free-floating sections. In order to discriminate non-specific staining from the chromogens we used different combinations of visualization methods, from adjacent serial sections of the same animals along the basal ganglia regions, and also have processed control sections where the primary antibodies were omitted.

To intensify the immunostaining of the cells synthesizing the CB1 receptor, an additional rat received an intracerebroventricular injection of colchicine (100  $\mu$ g/300 g b.w.) under 2,2,2-tribromoethanol anesthesia (0.2 g/kg b.w., i.p.; Fluka Chemika AG, Buchs, Switzerland). After a 24-h period following the colchicine injection, the brain of this animal was fixed and sectioned as described above and processed for single CB1-receptor immunostaining using the chromogen 3,3'-diaminobenzidine (DAB), as described below.

### Immunohistochemistry

Sections were washed with three changes of PBTB (PB 0.1M, pH 7.4, containing 0.3% of Triton X-100 and 0.3% of bovine serum albumin), followed by a blocking solution (PBTB containing 5% normal goat serum). The primary antibodies were diluted in this blocking solution (1:700 for the CB1 receptor and 1:800 for the TH). The CB1 receptor antibody was a rabbit polyclonal raised against a synthetic peptide corresponding to the first 14 amino acids on the amino terminus of the sequence for the rat receptor, and has been described and characterized elsewhere (Howlett et al., 1998). The TH antibody was a mouse monoclonal (MAB318, Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA). Sections were incubated for 2–3 days in the CB1 receptor antibody and for 1–2 days in the TH antibody, under continuous shaking at 4°C. Then, sections were washed several times in PBTB and incubated for 2 h with a goat biotinylated anti-mouse secondary antibody (1:1000). Then, sections were washed and incubated for 2 h with a goat anti-rabbit antibody labeled with Alexa Fluor 488 and streptavidin labeled with Alexa Fluor 568 (both from Molecular Probes, Leiden, The Netherlands: A-11008 and S-11226, respectively).

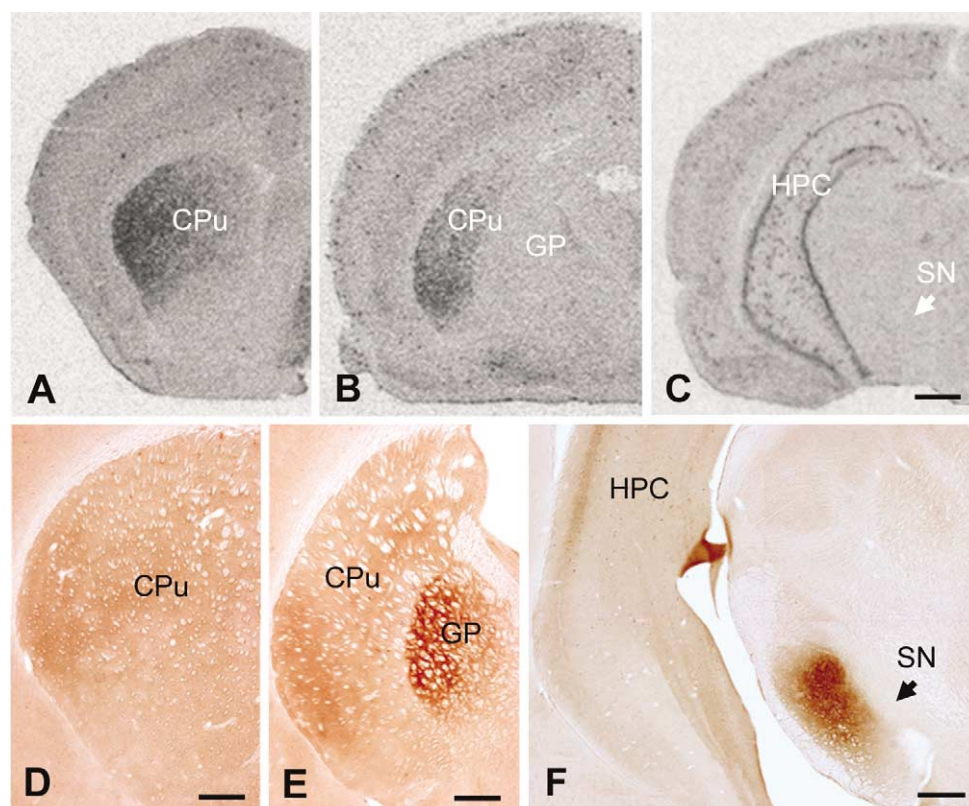
Single labeling with each primary antibody was also performed. Images of the sections were obtained by confocal microscopy.

Because no colocalization was detected with the fluorescent markers, we completed our study with a bright-field immunohistochemical technique. We used two different chromogens: DAB, which produces a brown reaction product; and DAB intensified with nickel sulfate (DAB-Ni), which produces a purple-gray product. First, sections were treated with 20% methanol and 0.9% hydrogen peroxide in PB to block endogenous peroxidase activity. Then, sections were washed and blocked for non-specific antigenicity with the same blocking solution as above. Sections were incubated for 2–3 days at 4 °C with the CB1 receptor primary antibody (diluted 1:500 in blocking solution). After the tissue was washed, sections were incubated with a biotinylated goat anti-rabbit secondary antibody. Sections were then washed and the avidin-biotin-peroxidase amplification complex (Pierce Chemical Company, Rockford, IL, USA) was applied. Thereafter, immunoreactive signal was visualized by reacting the sections either with DAB alone or with DAB-Ni. Following intense washings, the same sections were processed with the TH primary antibody (diluted 1:500 in PBTB) overnight at 4 °C, followed by a goat anti-mouse peroxidase-labeled secondary antibody. In this case, the chromogen reaction color used was different (DAB or DAB-Ni) from the one employed to reveal the CB1 receptor primary antibody reaction. The two combinations of DAB/DAB-Ni and DAB-Ni/DAB were investigated for the CB1 receptor/TH detection. Single immunolabeling with each of the chromogens was also performed with the two antigens under investigation.

## RESULTS

In the autoradiographic films, we observed high CB1 receptor mRNA expression in the dorsolateral part of the caudate putamen (CPu) at its rostral and middle levels, and in the ventral areas of its pole (Fig. 1A, B). The expression was gradually more intense toward the lateral part of the striatum and less intense in the ventral striatum. In the emulsion-dipped slides, it was evident that the hybridization signal was mainly in the medium-sized striatal neurons. The intensity of the hybridization signal (silver grains over the cells) was lower in the areas where a lighter-intensity labeling was observed in the films. Therefore, neurons on the more dorsal and lateral parts of the rostral and middle striatum exhibited the highest abundance of silver grains per cell. The number of grains gradually decreased toward the ventral striatum. Caudally, this labeling was more intense in the more ventral areas and decreased gradually toward the dorsal parts. We have not been able to detect CB1 receptor transcripts in the globus pallidus (GP), or in the substantia nigra (SN) neurons (Fig. 1B, C), even with long exposures. In contrast, TH transcripts were found only in the SN, with high expression in the pars compacta (SNc).

Sections processed for double-labeling *in situ* hybridization confirmed the absence of co-expression of CB1 receptors and TH. While SN neurons displayed digoxigenin-labeled TH mRNA (revealed with a purple precipitate), they did not exhibit silver grains, which are indicative of CB1 receptors labeled with  $^{35}$ S (Fig. 2C, E). Observations under darkfield microscope illumination confirmed the lack of CB1 receptor hybridization signal in the neurons labeled with the TH transcript (compare Fig. 2A and 2C). The sparse silver grains in this area represent background



**Fig. 1.** Coronal sections of rat brain processed for CB1-receptor *in situ* hybridization (A–C) and immunohistochemistry (D–F). A and D, rostral level of CPu; B and E, caudal level of CPu; and C and F, SN. Note the different gradients of intensity in the CPu, the lack of CB1-receptor mRNA in GP and SN, and the intense immunoreactivity in GP and SN. HPC, hippocampus. Bars=1 mm in C (same for A and B); 500  $\mu$ m in D–F.

labeling. Hippocampal neurons, from the same sections at the SN levels, were analyzed as positive-control markers for the CB1 receptor hybridization labeling. Hippocampal neurons exhibited intense CB1 receptor mRNA expression (Fig. 2B, D).

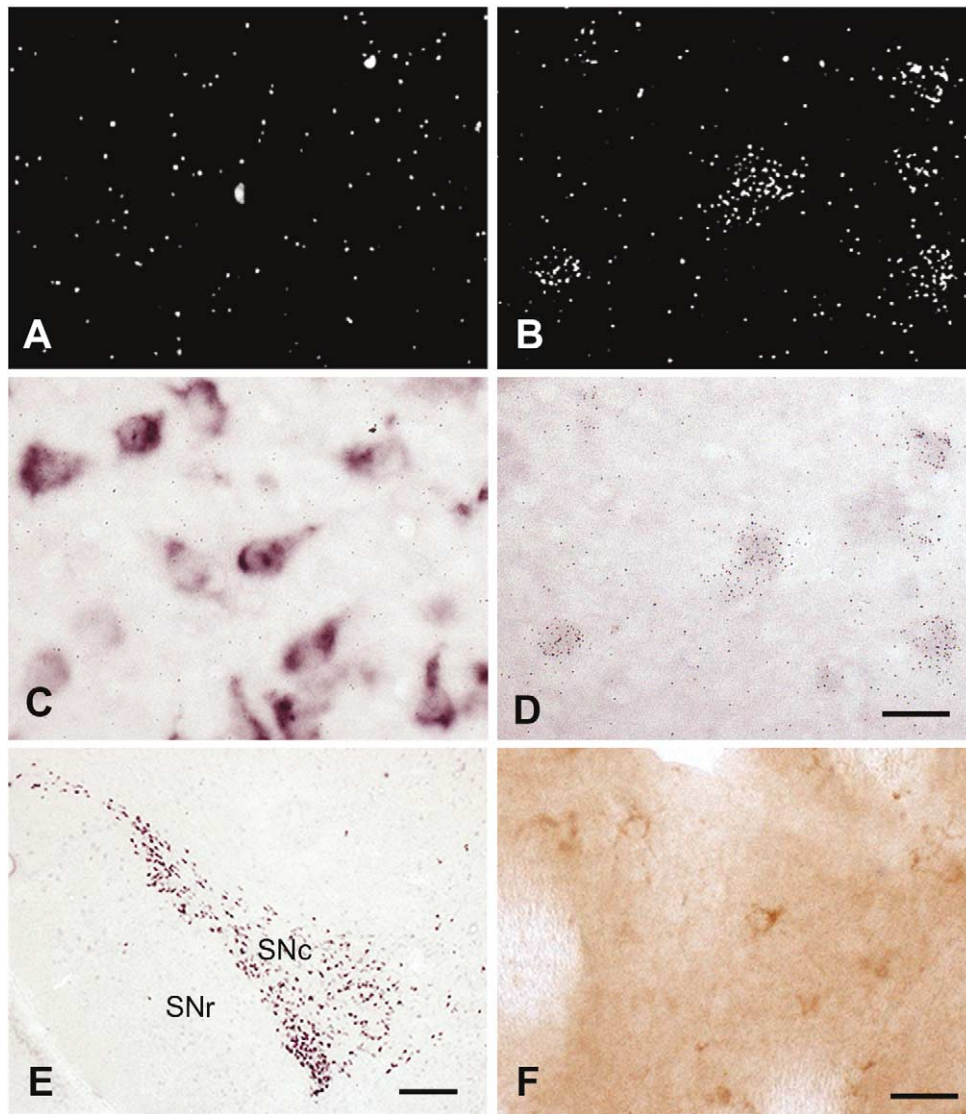
The intensity of the immunoreactive signal in the CPu was low. The mediolateral and dorsoventral gradients, although present and in parallel with the gradient of mRNA, were not pronounced (Fig. 1D, E; compare with Fig. 1A and 1B, respectively). Furthermore, although the whole CPu demonstrated moderate CB1 receptor immunoreactivity, no clearly labeled structures could be delineated. The labeled profiles had a dispersed, punctuate appearance, with little contrast between the weakly stained cell bodies and surrounding neuropil. Unlabeled fiber bundles were found throughout the CPu. The GP had CB1 receptor-immunoreactive fibers which were also heavily stained with a mediolateral gradient, in which the more lateral part stained with the highest intensity (Figs. 1E and 3A). In this area, individual CB1 receptor-immunoreactive fibers could not be sharply delineated but rather displayed the appearance of a meshwork of fibrillar bundles perforated by unlabeled fiber fascicles. In the SN, no CB1 receptor-immunoreactive cell bodies were observed, but the ventrolateral portions of the pars reticulata of the substantia nigra (SNr) showed an intense staining in a fibrillar accumulation arranged in the shape of an inverted “teardrop.” This appeared as a rounded dorsolateral part intensely labeled,

continued by a narrower part facing ventrally and medially (Figs. 1F and 4). This ventromedial part showed a gradual decrease in labeling intensity. A small triangular area located in the dorsomedial part of the SNr was weakly labeled. As in the GP, no individual CB1 receptor-immunoreactive fiber profiles could be delineated. Furthermore, since more fibers were concentrated in this area, and they were closely packed together, the CB1 receptor-immunoreactive fibrillar bundles could only be observed in the ventromedial parts, where there were lower numbers of immunopositive fibers.

Treatment with colchicine resulted in an intensification of the immunostaining for CB1 receptors in the cell bodies and dendrites of striatal medium-sized neurons (Fig. 2F). No CB1 receptor-immunoreactive cell bodies could be seen in either the GP or the SN (data not shown). However, colchicine treatment did not affect the pattern of CB1 receptor-immunoreactive fibers in the SN and GP.

There were intensely and homogeneously stained TH-immunoreactive neurons in the SNc, with some of the dendrites in this region penetrating and branching along the SNr. Scattered TH cell bodies were identified within the SNr, dispersing their processes to form a loose meshwork pattern. In the nigrostriatal projections, the TH-immunoreactive terminals formed a meshwork of fine fibers which showed intense immunostaining. These TH-immunoreactive fibers were more compacted and abundant in the CPu than in the GP.

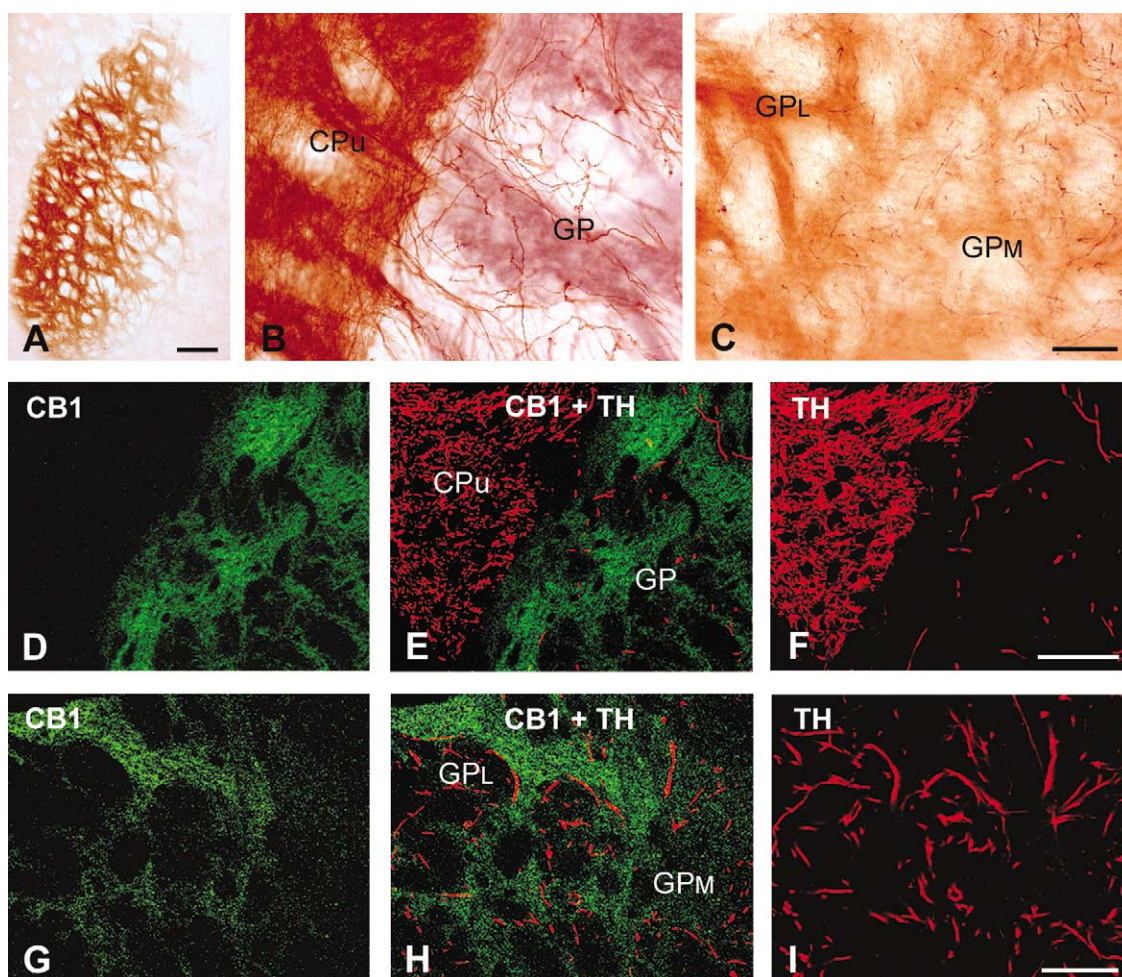




**Fig. 2.** (A–E) Double *in situ* hybridization for CB1 receptor mRNA ( $^{35}\text{S}$ -labeled, demonstrated by silver grains) and TH mRNA (digoxigenin-labeled, demonstrated by a purple product). Observe the expression of TH mRNA in neurons of the SNc and in few cells of the SNr (E), and the lack of CB1-receptor mRNA labeling (appreciable in C, at a higher magnification view of the SNc). Panel A shows the darkfield illumination view of the same area as in C, and reveals no silver grains in the TH mRNA-positive neurons. The scarce and randomly distributed silver grains in the SN correspond to a background labeling. A detail of the hippocampus of the same section as in C is shown as a positive-control area to demonstrate the hybridization of CB1-receptor transcripts, in B (darkfield) and D (bright-field). The silver grains indicate hippocampal cells expressing CB1-receptor mRNA. (F) Rat striatal medium-sized neurons showing intensified CB1-receptor immunostaining after colchicine treatment (revealed with DAB). Note the CB1-receptor immunoreactivity in membrane cell bodies and dendrites. Bars=25  $\mu\text{m}$  in D (same for A–C) and F; 400  $\mu\text{m}$  in E.

Double-labeling immunostaining did not reveal any co-localization between the CB1 receptors and TH-immunoreactive structures in the basal ganglia. While neuronal cell bodies immunoreactive for CB1 receptor were located in the CPu, those for TH were in the SN. There were separate immunoreactive fibers for CB1 receptor and TH in the CPu and GP (Fig. 3). These were distributed as a well-defined and dense network of fine TH-immunoreactive fibers mixed with less-defined CB1 receptor-immunoreactive punctuate or fibrillar structures. The CPu was filled with a dense network of TH-immunoreactive fibers, while in the GP these were more diffusely distributed. TH-immunoreactive fibers were

thus distributed in the same regions, and in close proximity, along the CB1 receptor terminals of striatonigral (direct pathway) or striatopallidal (indirect pathway) projection neurons. In the SNr, sparse TH-immunoreactive cells and fibers were embedded within a dense network of CB1 receptor-immunoreactive fibrillar structures (Fig. 4). The interwoven patterns of the TH-immunoreactive fibers in relationship with the CB1 receptor-immunoreactive fibrillar profiles could be more easily visualized in the ventromedial part of the SNr, where the intensity of CB1 receptor staining was lower while the TH-immunoreactive fibers were more abundant. In the areas close to the lateral and dorsal boundaries with the SNc, den-



**Fig. 3.** Coronal sections of rat striatum at the level of the caudal third of the CPu, processed for immunohistochemistry. (A) Rat GP immunolabeled with CB1-receptor antibody. Note the intense immunoreactivity of the fibers in the lateral part of the GP, contrasting with a weaker and more diffuse immunolabeling of the CPu and the gradually decreasing intensity toward the medial part of the GP. (B–I) Double immunostaining for CB1 receptor and TH by means of a combination of different chromogens: DAB-Ni (purple-gray color) for CB1 receptor and DAB (brown color) for TH in B; DAB for CB1 receptor and DAB-Ni for TH in C; and with immunofluorescence in D–I (green for CB1 receptor and red for TH). CB1-receptor immunostaining followed the same pattern as for the single labeling shown in A. The TH-immunoreactive fibers were distributed in close proximity and interwoven with CB1 receptor-immunoreactive neuropil and fibers, demonstrating a dense network in the CPu and a more dispersed distribution in the GP. No co-localization was found. GPL, lateral part of globus pallidus; GPM, medial part of globus pallidus. Bars=250  $\mu$ m in A; and 50  $\mu$ m in B–I.

dritic terminals from dopaminergic neurons of the SNc projected toward the SNr, intermingling between the intense CB1 receptor-immunoreactive terminals.

The results were the same for all the chromogens or fluorescent labels employed, either alone or in combination. There was no immunostaining in sections that had not been exposed to primary antibodies.

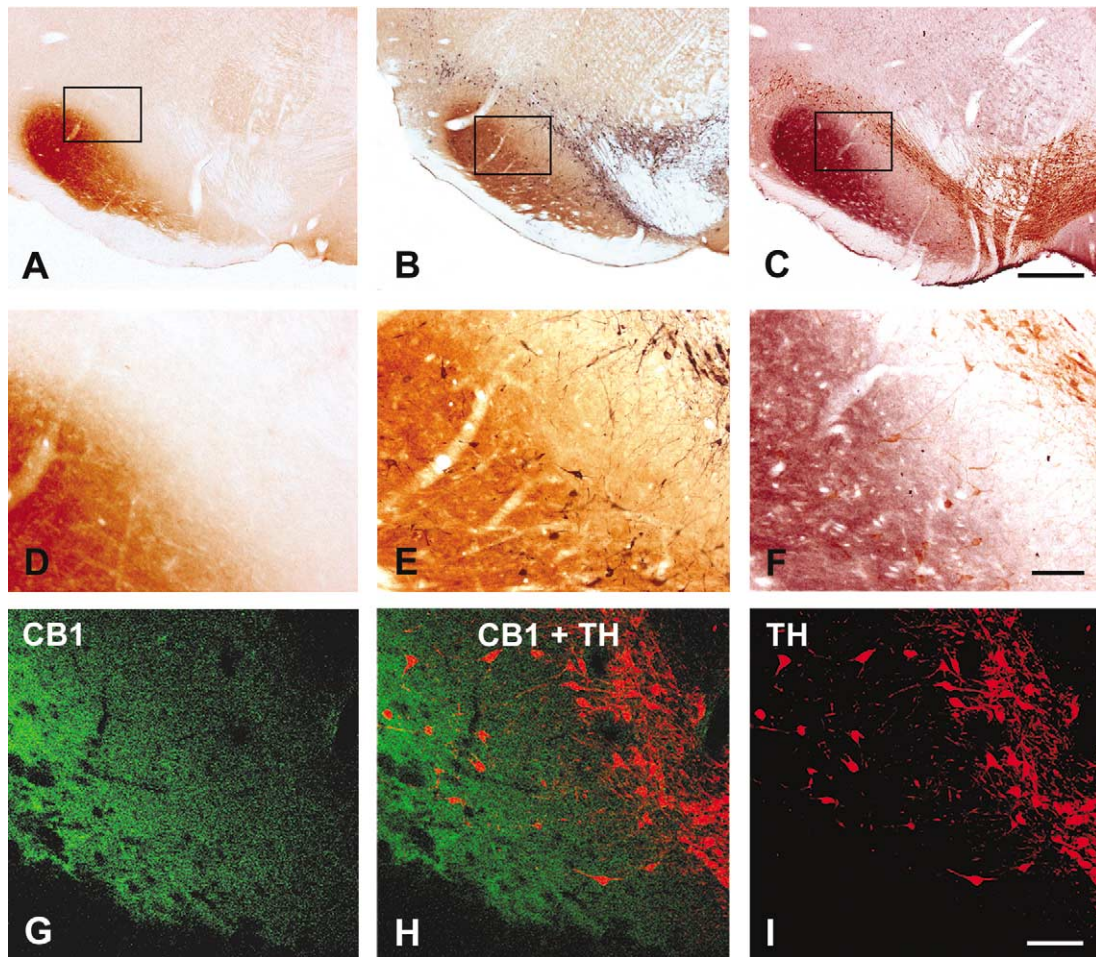
## DISCUSSION

The simultaneous study of the localization of the mRNA and protein for both the CB1 receptor and TH has allowed us to establish the neuroanatomical independence but intimate proximity in the arrangement of the circuitries of the cannabinoid and dopaminergic systems. In agreement with previous studies (Mailleux and Vanderhaeghen, 1992; Marsicano and Lutz, 1999; Hohmann and Herkenham, 2000), we have observed high CB1 receptor mRNA ex-

pression in the dorsolateral part of the rostral and middle thirds of the CPu, gradually moving down to the ventral areas as advancing toward the caudal third. In the GP and SN absence of CB1 receptor mRNA has also consistently been found, with the only exception of one report (Matsuda et al., 1993) where scattered cells with very low levels of labeling were observed. This single description contrasts with the rest of CB1 receptor mRNA studies. We have not been able to detect CB1 receptor mRNA in the SN even after very long hybridization exposure periods. Moreover, CB1 receptor binding in SN (and GP) almost completely disappears after ibotenic acid-induced lesions of the striatum (Herkenham et al., 1991a), giving further support to a lack of CB1 receptor mRNA expression in nigral and pallidal neurons.

The pattern of CB1 receptor immunostaining that we have found is consistent with previous observations in the





**Fig. 4.** Coronal sections of rat SN processed for immunohistochemistry. The squared areas in A, B and C mark the limits of their corresponding higher magnification images shown below in D, E and F, respectively. (A, D) Single immunohistochemistry for CB1 receptor in rat SN, illustrating an intense staining of the CB1 receptor-immunoreactive fibers in the dorsolateral and ventromedial parts of the SNr (appearing in the shape of an inverted “teardrop”), and with no CB1 receptor-immunoreactive neurons. (B–C and E–I) Double immunostaining for CB1 receptor and TH by means of a combination of different chromogens: DAB (brown color) for CB1 receptor and DAB-Ni (purple-gray color) for TH in B and E; DAB-Ni for CB1 receptor and DAB for TH in C and F; and with immunofluorescence in G–I (CB1-receptor immunoreactivity in green and TH immunoreactivity in red). CB1-receptor immunostaining followed the same pattern as for the single labeling shown in A and D. There were TH-immunoreactive neurons in the SNc with some dendrites penetrating in the SNr, and fewer TH-immunoreactive cell bodies dispersed in the part of the SNr with CB1 receptor-immunoreactive labeling. No co-localization between CB1 receptor and TH could be demonstrated. G–I were taken in the medial edge of the SN. Bars=500  $\mu$ m in A–C; and 100  $\mu$ m in D–I.

rat (Tsou et al., 1998; Pettit et al., 1998) and was clearly different from that of CB1 receptor mRNA. Our results are in agreement with those obtained by autoradiographic binding techniques (Herkenham et al., 1991a,b; Mailleux and Vanderhaeghen, 1992). We observed a very light-intensity labeling in the striatum and very few cell bodies could be distinguished. Since the CB1 receptor is a membrane receptor, a uniform cytoplasmic staining would represent the detection of an inactive form (either newly synthesized or in a degradation state). The low CB1-receptor immunoreactivity may represent receptors located presynaptically. Some CB1 presynaptic receptors have been described in the striatum in the following structures: afferent cortical axon terminals (Gerdeman and Lovinger, 2001; Huang et al., 2001), axons from striatal interneurons (Marsicano and Lutz, 1999; Hermann et al., 2002) and recurrent axons of projecting neurons (Szabo et al., 1998). We have only observed clear CB1-receptor

immunoreactivity in the CPu neuronal cell bodies and dendrites after colchicine treatment, indicating that these receptors could normally be transported to neuronal terminals. In the GP and SN no immunoreactive CB1-receptor cell bodies were observed, even after colchicine treatment, and this additionally reinforces the finding that there is no CB1-receptor synthesis in these areas, as reported above. To our knowledge, only one study has reported CB1-receptor immunoreactive neurons in the SNr (Moldrich and Wenger, 2000). Our results do not support these findings, since neither CB1 receptor protein nor CB1 receptor mRNA was found in the SN neurons. Instead, our data confirm that CB1 receptors are synthesized by medium-sized striatal neurons and that a number of these receptors are further transported along the projection efferent fibers, via the striatonigral and striatopallidal pathways, to be ultimately located presynaptically.



We have described a characteristic distribution of the CB1-receptor immunoreactivity in the SNr. Its pattern appears in the shape of an inverted teardrop with a bigger and more densely labeled area in the dorsolateral part and then narrowing and decreasing in immunoreactivity progressively toward the ventromedial extension of the SNr. Interestingly, a complementary pattern of expression has been reported for the cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) peptide (Dallvechia-Adams et al., 2001). CART distribution in the SNr delineates a small triangular dorsomedial area that, in our study, was only slightly labeled by the CB1 receptor antibody. Excitotoxic lesions have proven that CART-immunoreactive fiber terminals originate in medium spiny GABAergic projection neurons of the nucleus accumbens. In this respect, subdivisions of the rat SNr and their respective inter-connections with other brain regions have been reported (Deniau and Chevallier, 1992; Deniau et al., 1996; Maurin et al., 1999; Mailly et al., 2001). Cortical information received and processed in specific target areas of the striatum is further processed in functionally associated areas of the SN before flowing out to thalamo-cortical or brain stem pathways to execute movement. The projection area of the nucleus accumbens to the SNr (Deniau et al., 1994) resembles that of the CART-immunoreactive terminals, while the areas with a more intense CB1-receptor immunoreactivity correspond to striatal and sensorimotor cortical projections (Deniau et al., 1996). Moreover, the areas of the CPu which show higher concentration of CB1 receptors also resemble the projection areas of the sensorimotor cortex (McGeorge and Faull, 1989). Therefore, CB1 receptor-immunoreactive projections in the SNr appear to delineate a specific functional territory.

We have not detected any co-expression or co-localization of CB1 receptors with TH-positive structures in the basal ganglia. Our results indicate that CB1 receptors are not synthesized in the SN dopaminergic neurons. There were separate CB1 receptor- and TH-immunoreactive fibers in the CPu, GP and SN. Therefore, the proposal of the existence of CB1 receptors in dopaminergic terminals in striatum, based on theoretical grounds (Ameri, 1999), is not supported by our findings. However, since there is cumulative evidence revealing a functional relationship between the dopaminergic and cannabinoid systems, active contacts would have to exist in order to facilitate the corresponding cross-talk between them. Our data show that the ascending nigrostriatal dopaminergic fibers were closely interwoven with striatonigral and striatopallidal projection fibers containing the CB1 receptors. These projection fibers were reciprocally ending where the other protein is synthesized, indicating the existence of neuroanatomical contacts between these two systems. Additionally, since a co-expression of CB1 and dopamine receptors has been found in striatal projection neurons (Hermann et al., 2002), a functional relationship between CB1 receptors and dopamine receptors is therefore possible in these cells.

It is relevant to mention that co-localization between CB1 receptors and TH has been described in cultured fetal mesencephalic neurons (Hernandez et al., 2000). The ex-

planation of this result could be either that the CB1 receptors are atypically expressed during development due to a different physiological role during brain maturation (Fernandez-Ruiz et al., 2000) or that the phenotype of the mesencephalic neurons changes under the *in vitro* culture conditions. To our knowledge, no co-localization study for CB1 receptors and TH has been performed on fetal brain tissue, and our study is the first one done on adult brain tissue. Further research would then be necessary to give more insight on the *in vivo* neuroanatomical relationship between the CB1 receptors and dopaminergic systems during brain development. This would be of interest to better understand certain phenomena such as why pre- and perinatal exposures to cannabinoids affect the ontogeny of dopaminergic neurons (Rodriguez de Fonseca et al., 1991).

Our findings confirm that CB1 receptors are presynaptically located in striatal neuron terminals and do not exclude a postsynaptic localization as well, since neuronal cell bodies and dendrites immunoreactive for CB1 receptor were detected in the striatum after colchicine treatment. Previous electron microscopic studies have identified CB1-receptor immunoreactivity in the plasma membrane of cell bodies and dendrites in the rat CPu, particularly near asymmetric excitatory-type junctions, while few CB1 receptor-immunoreactive axon terminals formed asymmetric and more rarely symmetric synapses (Rodriguez et al., 2001). Some biochemical and pharmacological data give further support to these results. Acute administration of THC ( $\Delta$ -9-tetrahydrocannabinol) induces the activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (ERK) in the neuronal cell bodies and surrounding neuropil of the rat striatum (Valjent et al., 2001). This effect was completely inhibited by the selective CB1-receptor antagonist SR141716A. Moreover, this activation of CB1 receptors was dependent on dopaminergic transmission, since D1 dopamine receptor blockade by SCH23390, prior to THC administration, completely prevented ERK activation in the striatum. D2 dopamine receptors participated to a lesser extent in ERK activation, as deduced from the effect of the selective antagonist raclopride (Valjent et al., 2001). In addition, in rat striatal membranes, an interaction between CB1 receptor and both D1 and D2 receptors has been detected at the level of G-protein/adenylyl cyclase signal transduction (Meschler and Howlett, 2001). Both CB1 and D2 receptor agonists inhibited forskolin-stimulated adenylyl cyclase in a convergent signal transduction pathway, while D1 agonist produced stimulation of adenylyl cyclase, and this effect was inhibited by CB1-receptor agonist (implying a signal-transduction convergence). In cultures of striatal neurons the effects of CB1 and D2 receptor agonists, inhibiting adenylyl cyclase activity via a G-protein mechanism, have also been noted (Glass and Felder, 1997). For all these reasons, it is feasible that the dopamine effects on cannabinoid-receptor signaling mechanisms could be mediated by interactions between CB1 and dopamine receptors. Therefore, it is plausible that CB1 receptors distributed in the membrane of cell bodies and dendrites of striatal neurons

would be active in those postsynaptic sites. However, this possibility needs to be confirmed by further electron microscopic studies.

In summary, these data provide neuroanatomical basis to explain some of the mechanisms of interaction between the cannabinoid and dopaminergic systems. Our findings indicate that CB1 receptors are located on non-dopaminergic axon terminals of the GABAergic efferent striatal circuitry. These presynaptic CB1 receptors would inhibit neurotransmitter release and, because the end station of the majority of them is the SNr, the evoked disinhibition would indirectly activate dopaminergic neurons. Conversely, a different mechanism of action may explain the effects of dopamine on CB1 receptors. Since CB1 and dopamine receptors are coexpressed in striatal neurons, the activation of the postsynaptic dopamine receptors by the neurotransmitter dopamine may influence, by different signaling pathways, the functionality and/or expression of CB1 receptors in striatal neurons.

**Acknowledgements**—Plasmids for the CB1 receptor cDNA and TH cDNA were kindly provided by Dr. A. Santos, Universidad Complutense, Madrid, Spain, and Dr. J. Mallet, Hopital de la Pitie Salpetriere, Paris, France, respectively. The CB1-receptor antibody was a present from Dr. A. C. Howlett (North Carolina Central University, Durham, NC, USA). It is greatly appreciated the technical assistance of Concepcion Bailon and Carmen Hernandez for the confocal microscopy images. This work was supported by Plan Nacional sobre Drogas (from Ministerio del Interior), FIS (2001/0654) and MCT (BFI2001-CO2-01, SAF00-101, SAF00-121, SAF00-122) and the Commission of European Communities (QLRT-2000-01691).

## REFERENCES

- Aldridge JW, Berridge KC (1998) Coding of serial order by neostriatal neurons: a "natural action" approach to movement sequence. *J Neurosci* 18:2777–2787.
- Ameri A (1999) The effects of cannabinoids on the brain. *Prog Neurobiol* 58:315–348.
- Beltramo M, de Fonseca FR, Navarro M, Calignano A, Gorriti MA, Grammatikopoulos G, Sadile AG, Giuffrida A, Piomelli D (2000) Reversal of dopamine D(2) receptor responses by an anandamide transport inhibitor. *J Neurosci* 20:3401–3407.
- Breivogel CS, Childers SR (1998) The functional neuroanatomy of brain cannabinoid receptors. *Neurobiol Dis* 5 (6 pt B):417–431.
- Chan PK, Chan SC, Yung WH (1998) Presynaptic inhibition of GABAergic inputs to rat substantia nigra pars reticulata neurones by a cannabinoid agonist. *Neuroreport* 9:671–675.
- Chaperon F, Thiebot MH (1999) Behavioral effects of cannabinoid agents in animals. *Crit Rev Neurobiol* 13:243–281.
- Dallvechia-Adams S, Smith Y, Kuhar MJ (2001) CART peptide-immunoreactive projection from the nucleus accumbens targets substantia nigra pars reticulata neurons in the rat. *J Comp Neurol* 434:29–39.
- Deniau JM, Chevalier G (1992) The lamellar organization of the rat substantia nigra pars reticulata: distribution of projection neurons. *Neuroscience* 46:361–377.
- Deniau JM, Menetrey A, Thierry AM (1994) Indirect nucleus accumbens input to the prefrontal cortex via the substantia nigra pars reticulata: a combined anatomical and electrophysiological study in the rat. *Neuroscience* 61:533–545.
- Deniau JM, Menetrey A, Chaperon S (1996) The lamellar organization of the rat substantia nigra pars reticulata: segregated patterns of striatal afferents and relationship to the topography of corticostriatal projections. *Neuroscience* 73:761–781.
- Di Marzo V, Hill MP, Bisogno T, Crossman AR, Brotchie JM (2000) Enhanced levels of endogenous cannabinoids in the globus pallidus are associated with a reduction in movement in an animal model of Parkinson's disease. *FASEB J* 14:1432–1438.
- Fernandez-Ruiz J, Berrendero F, Hernandez ML, Ramos JA (2000) The endogenous cannabinoid system and brain development. *Trends Neurosci* 23:14–20.
- Gardner EL, Vorel SR (1998) Cannabinoid transmission and reward-related events. *Neurobiol Dis* 5:502–533.
- Gerdeman G, Lovinger DM (2001) CB1 cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsolateral striatum. *J Neurophysiol* 85:468–471.
- Gerdeman GL, Ronesi J, Lovinger DM (2002) Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nat Neurosci* 5:446–451.
- Gerfen CR (2000) Dopamine-mediated gene regulation in models of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 47 (4 suppl 1):S42–50.
- Giuffrida A, Parsons LH, Kerr TM, Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Piomelli D (1999) Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nat Neurosci* 2:358–363.
- Glass M, Felder CC (1997) Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor. *J Neurosci* 17:5327–5333.
- Graybiel AM (1996) Basal ganglia: new therapeutic approaches to Parkinson's disease. *Curr Biol* 6:368–371.
- Herkenham M, Lynn AB, de Costa BR, Richfield EK (1991a) Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat. *Brain Res* 547:267–274.
- Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC (1991b) Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci* 11:563–583.
- Hermann H, Marsicano G, Lutz B (2002) Coexpression of the cannabinoid receptor type 1 with dopamine and serotonin receptors in distinct neuronal subpopulations of the adult mouse forebrain. *Neuroscience* 109:451–460.
- Hernandez M, Berrendero F, Suarez I, Garcia-Gil L, Cebeira M, Mackie K, Ramos JA, Fernandez-Ruiz J (2000) Cannabinoid CB(1) receptors colocalize with tyrosine hydroxylase in cultured fetal mesencephalic neurons and their activation increases the levels of this enzyme. *Brain Res* 857:56–65.
- Hohmann AG, Herkenham M (2000) Localization of cannabinoid CB(1) receptor mRNA in neuronal subpopulations of rat striatum: a double-label in situ hybridization study. *Synapse* 37:71–80.
- Howlett AC (1998) The CB1 cannabinoid receptor in the brain. *Neurobiol Dis* 5:405–416.
- Howlett AC, Song C, Berglund BA, Wilken GH, Pigg JJ (1998) Characterization of CB1 cannabinoid receptors using receptor peptide fragments and site-directed antibodies. *Mol Pharmacol* 53:504–510.
- Huang CC, Lo SW, Hsu KS (2001) Presynaptic mechanisms underlying cannabinoid inhibition of excitatory synaptic transmission in rat striatal neurons. *J Physiol* 532:731–748.
- Mailleux P, Vanderhaeghen JJ (1992) Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience* 48:655–668.
- Mailleux P, Vanderhaeghen JJ (1993) Dopaminergic regulation of cannabinoid receptor mRNA levels in the rat caudate-putamen: an in situ hybridization study. *J Neurochem* 61:1705–1712.
- Mailly P, Chaperon S, Mahon S, Menetrey A, Thierry AM, Glowinski J, Deniau JM (2001) Dendritic arborizations of the rat substantia nigra pars reticulata neurons: spatial organization and relation to the lamellar compartmentation of striato-nigral projections. *J Neurosci* 21:6874–6888.

- Marsicano G, Lutz B (1999) Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur J Neurosci* 11:4213–4225.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346:561–564.
- Matsuda LA, Bonner TI, Lolait SJ (1993) Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *J Comp Neurol* 327:535–550.
- Maurin Y, Banrezes B, Menetrey A, Mailly P, Deniau JM (1999) Three-dimensional distribution of nigrostriatal neurons in the rat: relation to the topography of striatonigral projections. *Neuroscience* 91:891–909.
- McGeorge AJ, Faull RL (1989) The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience* 29:503–537.
- Meschler JP, Howlett AC (2001) Signal transduction interactions between CB1 cannabinoid and dopamine receptors in the rat and monkey striatum. *Neuropharmacology* 40:918–926.
- Miller AS, Walker JM (1995) Effects of a cannabinoid on spontaneous and evoked neuronal activity in the substantia nigra pars reticulata. *Eur J Pharmacol* 279:179–185.
- Moldrich G, Wenger T (2000) Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain: an immunohistochemical study. *Peptides* 21:1735–1742.
- Moratalla R, Vickers EA, Robertson HA, Cochran BH, Graybiel AM (1993) Coordinate expression of c-fos and jun B is induced in the rat striatum by cocaine. *J Neurosci* 13:423–433.
- Mottola DM, Kilts JD, Lewis MM, Connery HS, Walker QD, Jones SR, Booth RG, Hyslop DK, Piercey M, Wightman RM, Lawler CP, Nichols DE, Mailman RB (2002) Functional selectivity of dopamine receptor agonists: I. Selective activation of postsynaptic dopamine D2 receptors linked to adenylate cyclase. *J Pharmacol Exp Ther* 301:1166–1178.
- Pettit DA, Harrison MP, Olson JM, Spencer RF, Cabral GA (1998) Immunohistochemical localization of the neural cannabinoid receptor in rat brain. *J Neurosci Res* 51:391–402.
- Rodriguez JJ, Mackie K, Pickel VM (2001) Ultrastructural localization of the CB1 cannabinoid receptor in mu-opioid receptor patches of the rat caudate putamen nucleus. *J Neurosci* 21:823–833.
- Rodriguez de Fonseca F, Cebeira M, Fernandez-Ruiz JJ, Navarro M, Ramos JA (1991) Effects of pre- and perinatal exposure to hashish extracts on the ontogeny of brain dopaminergic neurons. *Neuroscience* 43:713–723.
- Rodriguez de Fonseca F, Del Arco I, Martin-Calderon JL, Gorriti MA, Navarro M (1998) Role of the endogenous cannabinoid system in the regulation of motor activity. *Neurobiol Dis* 5:483–501.
- Romero J, Garcia L, Cebeira M, Zdrozny D, Fernandez-Ruiz JJ, Ramos JA (1995) The endogenous cannabinoid receptor ligand, anandamide, inhibits the motor behavior: role of nigrostriatal dopaminergic neurons. *Life Sci* 56:2033–2040.
- Romero J, Berrendero F, Perez-Rosado A, Manzanares J, Rojo A, Fernandez-Ruiz JJ, de Yebenes JG, Ramos JA (2000) Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of nigrostriatal dopaminergic neurons increased CB1 receptor mRNA levels in the caudate-putamen. *Life Sci* 66:485–494.
- Schlicker E, Kathmann M (2001) Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends Pharmacol Sci* 22:565–572.
- Silverdale MA, McGuire S, McInnes A, Crossman AR, Brotchie JM (2001) Striatal cannabinoid CB1 receptor mRNA expression is decreased in the reserpine-treated rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 169:400–406.
- Souilhac J, Poncelet M, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Soubrie P (1995) Intrastriatal injection of cannabinoid receptor agonists induced turning behavior in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 51:3–7.
- Szabo B, Dorner L, Pfreundtner C, Norenberg W, Starke K (1998) Inhibition of GABAergic inhibitory postsynaptic currents by cannabinoids in rat corpus striatum. *Neuroscience* 85:395–403.
- Szabo B, Muller T, Koch H (1999) Effects of cannabinoids on dopamine release in the corpus striatum and the nucleus accumbens in vitro. *J Neurochem* 73:1084–1089.
- Tsou K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K, Walker JM (1998) Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 83:393–411.
- Valjent E, Pages C, Rogard M, Besson MJ, Maldonado R, Caboche J (2001) Delta 9-tetrahydrocannabinol-induced MAPK/ERK and Elk-1 activation in vivo depends on dopaminergic transmission. *Eur J Neurosci* 14:342–352.
- Westlake TM, Howlett AC, Bonner TI, Matsuda LA, Herkenham M (1994) Cannabinoid receptor binding and messenger RNA expression in human brain: an in vitro receptor autoradiography and in situ hybridization histochemistry study of normal aged and Alzheimer's brains. *Neuroscience* 63:637–652.
- Wu Q, Reith ME, Walker QD, Kuhn CM, Carroll FI, Garriss PA (2002) Concurrent autoreceptor-mediated control of dopamine release and uptake during neurotransmission: an in vivo voltammetric study. *J Neurosci* 22:6272–6281.
- Zeng BY, Dass B, Owen A, Rose S, Cannizzaro C, Tel BC, Jenner P (1999) Chronic L-DOPA treatment increases striatal cannabinoid CB1 receptor mRNA expression in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Neurosci Lett* 276:71–74.

(Accepted 18 December 2002)

# Expression and Function of CB<sub>1</sub> Receptor in the Rat Striatum: Localization and Effects on D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> Dopamine Receptor-Mediated Motor Behaviors

Ana Belén Martín<sup>1</sup>, Emilio Fernandez-Espejo<sup>\*2</sup>, Belén Ferrer<sup>3,4</sup>, Miguel Angel Gorriti<sup>4</sup>, Ainhoa Bilbao<sup>3</sup>, Miguel Navarro<sup>4</sup>, Fernando Rodriguez de Fonseca<sup>\*3,4</sup> and Rosario Moratalla<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, Spain; <sup>2</sup>Departamento de Fisiología Médica, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain; <sup>3</sup>Fundación IMABIS, Hospital Regional Universitario Carlos Haya, Málaga, Spain; <sup>4</sup>Instituto Universitario de Drogodependencias, Departamento de Psicobiología, Universidad Complutense, Madrid, Spain

Cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors are densely expressed on striatal projection neurons expressing dopamine D<sub>1</sub> or D<sub>2</sub> receptors. However, the specific neuronal distribution of CB<sub>1</sub> receptors within the striatum is not known. Previous research has established that the endocannabinoid system controls facilitation of behavior by dopamine D<sub>2</sub> receptors, but it is not clear if endocannabinoids also modulate D<sub>1</sub> receptor-mediated motor behavior. In the present study, we show that cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor mRNA is present in striatonigral neurons expressing substance P and dopamine D<sub>1</sub> receptors, as well as in striatopallidal neurons expressing enkephalin and dopamine D<sub>2</sub> receptors. We explored the functional relevance of the interaction between dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors and cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors with behavioral pharmacology experiments. Potentiation of endogenous cannabinoid signaling by the uptake blocker AM404 blocked dopamine D<sub>1</sub> receptor-mediated grooming and D<sub>2</sub> receptor-mediated oral stereotypies. In addition, contralateral turning induced by unilateral intrastratial infusion of D<sub>1</sub> receptor agonists is counteracted by AM404 and potentiated by the cannabinoid antagonist SR141716A. These results indicate that the endocannabinoid system negatively modulates D<sub>1</sub> receptor-mediated behaviors in addition to its previously described effect on dopamine D<sub>2</sub> receptor-mediated behaviors. The effect of AM404 on grooming behavior was absent in dopamine D<sub>1</sub> receptor knockout mice, demonstrating its dependence on D<sub>1</sub> receptors. This study indicates that the endocannabinoid system is a relevant negative modulator of both dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptor-mediated behaviors, a finding that may contribute to our understanding of basal ganglia motor disorders.

*Neuropsychopharmacology* (2008) **33**, 1667–1679; doi:10.1038/sj.npp.1301558; published online 24 October 2007

**Keywords:** cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors; dopamine D<sub>1</sub> receptors; basal ganglia; motor control; striatum

## INTRODUCTION

Cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors are expressed in brain areas that contribute to movement such as the basal ganglia. The highest concentration of CB<sub>1</sub> receptors is found in the striatum, where they colocalize with dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors in striatal neurons (Herkenham *et al*, 1990, 1991; Tsou *et al*, 1998; Hermann *et al*, 2002; Julián *et al*, 2003). However, their regional and neuronal distribution has not

been established. It is known that there is a continuous release of endogenous cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor agonists such as anandamide in the brain, and that these endogenous agonists exhibit neurotransmitter function (Giuffrida *et al*, 1999; Baker *et al*, 2000). The endocannabinoid system can act as a modulator of dopaminergic neurotransmission in the basal ganglia (Cadogan *et al*, 1997; Glass and Felder, 1997; Pertwee, 1999; Giuffrida *et al*, 1999; Beltramo *et al*, 2000; Gerdeman and Lovinger, 2001; Gubellini *et al*, 2002). Endogenous cannabinoids have been proposed to act in a homeostatic mechanism in the basal ganglia by activating CB<sub>1</sub> receptors, which appear to function as a brake on dopaminergic function in the striatum (Rodriguez de Fonseca *et al*, 1994, 1998).

Although much is known about the central effects of exogenously applied cannabinoids, the functional relevance of the endogenous cannabinoid system needs further investigation. In this context, the discovery of the highly potent CB<sub>1</sub> receptor antagonist, SR141716A, and the

\*Correspondence: Dr E Fernandez-Espejo, Departamento de Fisiología Médica, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla, Sevilla 41009, Spain, Tel: + 34 95 455 6584, E-mail: efespejo@us.es or Dr FR de Fonseca, Fundación IMABIS, Hospital Regional Universitario Carlos Haya, Málaga 29010, Spain, Tel: + 34 95 103 0447, E-mail: fernando.rodriguez@fundacionimabis.org or Dr R Moratalla, Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid 28002, Spain, Tel: + 34 91 585 4705, Fax: + 34 91 585 4754, E-mail: moratalla@cajal.csic.es  
Received 3 January 2007; revised 5 July 2007; accepted 31 July 2007

indirect agonist *N*-(4-hydroxyphenyl)-arachidonamide (AM404, which acts as an anandamide uptake blocker) have opened new possibilities for the identification and characterization of cannabinoid-dependent function. Particularly, the use of SR141716A has shown a close relationship between CB<sub>1</sub> receptors and striatal dopamine D<sub>1</sub>, and D<sub>2</sub> receptor-mediated functions (Rodríguez de Fonseca *et al*, 1994, 1998). AM404, through blockade of the endocannabinoid transporters, causes accumulation of anandamide and 2-arachidonoylglycerol (2-AG), prolonging dopamine-mediated responses of endogenous cannabinoids (Beltramo *et al*, 2000; Glaser *et al*, 2003). The effects of CB<sub>1</sub> receptor antagonists in the striatum are proposed to be due to release from the inhibitory influence of endogenous CB<sub>1</sub> receptor agonists on striatal dopamine D<sub>2</sub> receptor function (Rodríguez de Fonseca *et al*, 1994, 1998; Giuffrida *et al*, 1999). However, several studies suggest that D<sub>1</sub> and CB<sub>1</sub> receptors also interact negatively in several rodent behaviors (Sañudo-Peña *et al*, 1998a). Determining the functional interaction between CB<sub>1</sub> and D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors in the striatum is important for understanding neurochemical changes in diseases such as Parkinsonism and schizophrenia and in adaptive processes including the rewarding effects of drugs of abuse. Dopamine receptor agonists and antagonists are currently used therapeutically for these disorders and there is emerging evidence that CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor antagonists have a therapeutic effect in some of these disorders as well (Fernandez-Espejo *et al*, 2005; Sañudo-Peña *et al*, 1998b).

The functional interaction between striatal CB<sub>1</sub> and D<sub>1</sub>, and D<sub>2</sub> dopamine receptors can be studied by examining the effect of pharmacological modulation of these receptors on motor activity in rats. Because dopamine agonists injected into the striatum induce turning behavior, this behavioral response represents an index of dopaminergic imbalance between the two hemispheres (Ungerstedt and Arbuthnott, 1970; Schwarting and Huston, 1996; Gerfen *et al*, 1990; Keefe and Gerfen, 1995; Pavón *et al*, 2006). For example, unilateral intrastratial injection of D<sub>1</sub> receptor agonist induces contralateral turns (Keefe and Gerfen, 1995; Pavón *et al*, 2006). D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptor functions can be assessed through specific behavioral patterns as well, since these behaviors are mostly modulated at the striatal level (McPherson and Marshall, 1996; Davidkova *et al*, 1998). Some of these responses are mediated by D<sub>2</sub> receptors, like oral movements (mouth fasciculation, yawning, biting, licking) while others like grooming are mediated by dopamine D<sub>1</sub> receptor stimulation (Molloy and Waddington, 1984; Starr and Starr, 1986a,b; McPherson and Marshall, 1996). These behaviors have been extensively studied using *in vivo* pharmacology and electrophysiology and have been shown to reflect striatal function (Aldridge and Berridge, 1998).

We hypothesized that endogenous cannabinoids modulate both D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> dopamine-induced motor behaviors through the interaction of CB<sub>1</sub> receptors. To characterize the functional neuroanatomy of cannabinoid receptor interaction in the basal ganglia, we analyzed the distribution of cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors and dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors in the striatum. To assess the functional role of endogenous cannabinoids in behavioral responses mediated by dopamine D<sub>1</sub> or D<sub>2</sub> receptors, we examined turning

behavior, grooming, and oral stereotypies. We also used a dopamine D<sub>1</sub> receptor knockout (D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>) mouse to support further the specificity of the responses studied.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

Studies were carried out in inbred adult male Wistar rats, ranging from 2 to 3 months old, weighing 250–300 g or in male wild-type and dopamine D<sub>1</sub> receptor knockout (D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>) mice (Xu *et al*, 1994; Moratalla *et al*, 1996) derived from the mating of heterozygous mice, weighing 24–28 g. The genotype of each mouse was determined by genomic Southern blot analysis. Animals were housed in a temperature-controlled room (22 ± 1°C) on a 12-h light–dark cycle (lights on at 0800 h) with free access to food and water. The maintenance of animals and the experimental procedures were approved by the bioethical committee at the Cajal Institute and followed the guidelines from the European Union (Council Directive 86/609/EEC).

### Drugs and Doses

The dopamine D<sub>1</sub> receptor agonists SKF38393 or SKF81297 (Tocris, Bristol, UK) dissolved in double distilled water and quinpirole (a dopamine D<sub>2</sub> receptor agonist, RBI, Natick, USA) dissolved in 20% ethanol were administered at 0, 0.5, and 1 µg/µl for intrastratial injections and 5 mg/kg (SKF38393, SKF81297) or 1 mg/kg (quinpirole) for subcutaneous administration. The D<sub>2</sub> receptor agonist bromocriptine and CB<sub>1</sub> agonist HU-210 (Tocris, UK) were each dissolved in 10% ethanol with double-distilled water. Bromocriptine was administered by intrastratial injection at 0.5 and 10 µg/µl, and HU-210 was administered at a dose of 20 µg/kg, i.p. (intraperitoneal). The CB<sub>1</sub> antagonist SR141716A (gift from Sanofi-Synthelabo Recherche, France), dissolved in 20% DMSO, was administered at 0, 1, and 1.5 µg/µl for intrastratial injection or 0.3 and 1 mg/kg, i.p. AM404 (the anandamide uptake blocker, Tocris), dissolved in Tween 80:propylen glycol:saline (5:5:90, by vol/vol), was administered at 0, 2.5, and 5 µg/µl for intrastratial injection and 0.3 or 10 mg/kg for i.p. administration. Local injections in the striatum were performed in a volume of 1.5 µl. In each case, the same volume of appropriate vehicle was used for the 0 dose. We followed a previous method for selecting the injection site (Routtenberg, 1972). Using this method, an injection of 1.5 µl diffuses over approximately 3 mm<sup>3</sup>, sufficient to affect a significant area of the striatum (Routtenberg, 1972). When postmortem analysis revealed injection sites that were off the target area, those animals were not included in the analysis.

### Tissue Preparation for *In Situ* Hybridization

Rats were euthanized by rapid decapitation and their brains were quickly removed, frozen in dry ice and stored at –80°C. Complete rostro-caudal series of coronal sections (12 µm thick) were cut in a cryostat (Leica, Wetzlar, Germany), thaw mounted onto microscope slides, air-dried and stored at –80°C.

## Riboprobe Synthesis and Labeling

We used the following riboprobes: a 492 bp cRNA probe complementary to rat preproenkephalin (pro-Enk) cDNA plasmid provided by Dr Sabol (NIH, Maryland, USA); a 480 bp cRNA for rat  $\beta$ -preprotachykinin, substance P (SP), provided by Dr James E Krause (Branford, USA); a 430 bp cRNA for rat somatostatin (Som), provided by Dr Cacicedo (Hospital Ramón y Cajal, Spain); a 700 bp cRNA for rat parvalbumin (PVB), provided by Dr Berchtold, (Universitat Zurich, Switzerland); a 694 bp cRNA for rat choline acetyltransferase (ChAT), provided by Dr Berrard (Hôpital de la Pitié Salpêtrière, Paris); a 326 bp cRNA for rat glutamic acid decarboxylase 67 (GAD67), provided by Dr Tillakaratne (University of California, USA), and a 1619 bp cRNA for the human CB<sub>1</sub> receptor provided by Dr Santos (Universidad Complutense de Madrid, Spain). Riboprobes were labeled with <sup>35</sup>S-isotope (<sup>35</sup>S-CTP) or with digoxigenin 11-UTP to carry out dual *in situ* hybridization. Riboprobes were synthesized by *in vitro* transcription as in Julián *et al* (2003). Briefly, 1  $\mu$ g of the appropriate template was reacted with 350  $\mu$ Ci of a <sup>35</sup>S-CTP (1000 Ci/mmol, NEN, MA, USA), 50  $\mu$ M unlabeled CTP, 20 mM each of ATP, GTP, and UTP, 15–20 units of the appropriate RNA polymerase, 100 mM of dithiothreitol (DTT), and 20 units of RNasin (Promega Corporation, Madison, USA) for 1 h at 37°C. Digoxigenin-labeled probes were synthesized with 1  $\mu$ g of the appropriate template, 2  $\mu$ l of digoxigenin RNA labeling mix (10  $\times$ ) (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany), 15–20 units of appropriate RNA polymerase and 20 units of RNasin and incubated for 2 h at 37°C. Labeled riboprobes were purified by ethanol precipitation and resuspended in TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.6) containing 100 mM DTT (for <sup>35</sup>S labeled probes only) and 40 units of RNase inhibitor and stored at –80°C.

## In Situ Hybridization

Selected sections were fixed in 4% paraformaldehyde, acetylated, rinsed in PBS, dehydrated with ethanol, and defatted in chloroform. <sup>35</sup>S-labeled CB<sub>1</sub> receptor riboprobe (alone or in combination with a digoxigenin-labeled riboprobe chosen as a marker of striatal neurons) were mixed in a hybridization solution, applied to sections, and hybridized for 12 h at 60°C. Radioactive labeled probes were diluted in the hybridization solution to reach a 60 000–80 000 c.p.m./ $\mu$ l and digoxigenin-labeled probes were diluted 1:100. After hybridization, slides were rinsed in saline sodium citrate solution (SSC), treated with RNase A (100  $\mu$ g/ml) and finally washed in SSC at 65°C. For single *in situ* hybridization, slides were placed in cassettes and exposed to Hyperfilm  $\beta$ Max (Amersham Pharmacia Biotech, Barcelona, Spain) for 3–5 days. Films were developed in D-19 (Eastman Kodak, NY, USA) and analyzed with an image analysis system. For dual *in situ* hybridization, slides were processed to detect the second mRNA labeled with digoxigenin. Slides were incubated overnight with alkaline phosphatase-conjugated polyclonal anti-digoxigenin antiserum (Roche Molecular Biochemicals) diluted 1:1000. The following day, slides were incubated in the dark with nitro blue tetrazolium, (NBT, 0.34 mg/ml) and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphato (BCIP; 0.175 mg/ml). Reaction progress was monitored

with a light microscope for the development of color. After exposure to Hyperfilm  $\beta$ Max films, selected slides were dipped in nuclear track emulsion LM1 (Eastman Kodak, New York, USA) diluted 3:1 in distilled water with 0.1% glycerol, stored in the dark with desiccant and developed after 2–6 weeks.

## In Situ Hybridization Analysis

Quantitative analysis of CB<sub>1</sub> receptor mRNA on each striatal neuronal population was carried out by quantifying the number of silver grains and their distribution in digoxigenin-labeled neurons using a computer assisted image system (Qwin 500, Leica Microsistemas SA, Barcelona, Spain). Both the area of the neuronal profile ( $\mu$ m<sup>2</sup>) and the number of grains present within the area were recorded and used to compute the intensity of labeling of each neuron (expressed as grains per 1.000  $\mu$ m<sup>2</sup>). For each striatal neuronal population, we quantified grains over a minimum of 2000 neurons per hemisphere. We used three animals, two coronal sections (200–300  $\mu$ m apart) per animal. Statistical analysis was performed by one-way analyses of variance (ANOVA) with a repeated measures design, followed by Student's *t*-test and *post hoc* comparison with Bonferroni–Dunnett test for each population of striatal neurons to determine differences in CB<sub>1</sub> receptor expression. Differences with a  $\sigma < 0.05$  were considered significant.

## Behavioral Studies

**Grooming and oral movements.** Rats and mice (eight per group) were handled and placed in a glass observation box of 30  $\times$  40  $\times$  30 cm for a week. For behavioral studies, animals were videotaped in the familiar glass box and the time spent grooming and the number of oral stereotypies were registered by trained observers blind to the experimental conditions, as described previously (Beltramo *et al*, 2000; Giuffrida *et al*, 1999). Grooming behavior and oral movements were scored over 5 min intervals at 5, 15, 30, and 60 min after the injection. Data are presented as a sum of all time intervals (mean  $\pm$  SEM). Statistical analysis was performed using one- or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student or Newman–Keuls *post hoc* test. These analyses were completed using STATA program (Intercooled Stata 6.0, Stata Corporation, College Station, TX). A probability level of 5% ( $p < 0.05$ ) was considered significant.

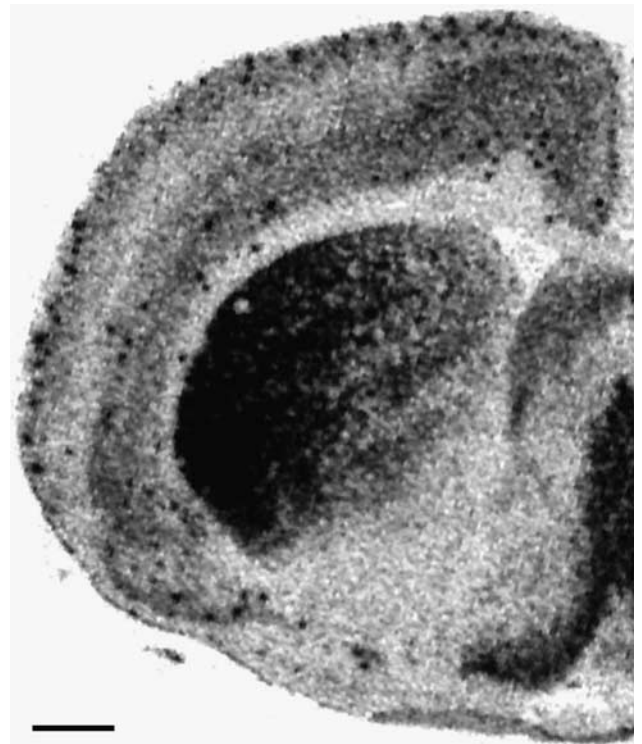
**Rotational behavior.** Local injections in the rat striatum were carried out with a guide cannula implanted a week before the experimental studies. The guide cannula (22 gauge stainless steel) was placed in the rat striatum, under anesthesia, with a Kopf stereotaxic frame, 2 mm above the corresponding infusion site (coordinates in mm from bregma and dura, AP = +0.5, L = –3, and V = –5.5; Paxinos and Watson, 2005), fastened to the skull with dental cement and fitted with a 30-gauge stainless steel obturator. Injections were performed in the home cage, replacing the obturator cannula by a 30-gauge internal cannula (Small Parts, Miami, USA) connected to a Hamilton syringe and a delivery pump. Solutions were injected over a 5 min period, and afterwards the internal cannula was

removed and the obturator cannula replaced. There were 8–10 animals in each group for behavioral studies. To study effects of compounds alone, SKF38393, quinpirole, bromocriptine, or CB<sub>1</sub> ligands were infused at different doses in different groups. To study the interaction between dopaminergic and cannabinoid systems we used vehicle, 0.5 or 1 µg/µl SKF38393, following a Latin square type design, changing the initial dose of dopaminergic ligand for every rat (one group of rats for each dopaminergic ligand). Vehicle, SR141716A (1.5 µg/µl) or AM404 (5 µg/µl) were injected 5 min before SKF38393. These doses elicit maximum turning behavior. If both cannabinoid ligands were injected, SR141716A was injected 5 min before AM404, and SKF38393 was injected 5 min after AM404. Locomotor directional bias was evaluated by quantifying ipsilateral and contralateral rotations induced by the infusion of compounds alone or in combination. Rotations were quantified for 60 min following injections with a rotometer system (Panlab, Barcelona, Spain). For statistical analysis we used one-way ANOVA for drugs administered alone (drug dose as factor) and two-way ANOVA for combinations of drugs (SKF38393 dose as within variable, treatment as in between factor), followed by *post hoc* comparisons with Tukey's test for drug interactions. After completion of experiments, rats were anesthetized and perfused transcardially with 4% paraformaldehyde. Brains were removed and stored in PBS at 4°C, for subsequent sectioning (50 µm). Brain sections were mounted on slides and stained with cresyl violet to examine cannula placements.

## RESULTS

### Expression of CB<sub>1</sub> Receptor mRNA in Substance P- and Enkephalin-Expressing Striatal Neurons

The hybridization signal obtained with each of the riboprobes used in this study was specific and reproducible. The specificity of the probes was determined by hybridizing with labeled sense riboprobe, which did not yield any signal, and by including a 25-fold excess of cold cRNA in the hybridization solution, which obliterated the signal. Sections hybridized with the CB<sub>1</sub> receptor antisense riboprobe demonstrated an intense signal in the striatum consistent with our previous single-label study of CB<sub>1</sub> receptors in the rat (Julián *et al*, 2003) and other studies (Hermann *et al*, 2002). CB<sub>1</sub> mRNA expression exhibited a lateromedial gradient, more intense in the lateral striatum with a gradual decrease to a less intense signal in the medial striatum (Figure 1). Interestingly, towards the medial striatum, signal intensity was higher in patches reminiscent of striosomes, with lower signal intensity in the surrounding matrix (Julián *et al*, 2003). Similar results were obtained with emulsion-dipped slides; neurons in the lateral part of the striatum had more intense signal than those in the medial part. Signal in the nucleus accumbens was low (Figure 1). To determine whether CB<sub>1</sub> receptors in the striatum are coexpressed with dopamine D<sub>1</sub> or D<sub>2</sub> receptors, we conducted dual-label hybridization experiments with <sup>35</sup>S-labeled riboprobe for CB<sub>1</sub> receptor in combination with digoxigenin labeled riboprobes for preproenkephalin (Enk, a marker for neurons that express D<sub>2</sub> receptors) or β-preprotachykinin (SP, marker for neurons that express D<sub>1</sub> receptors). For



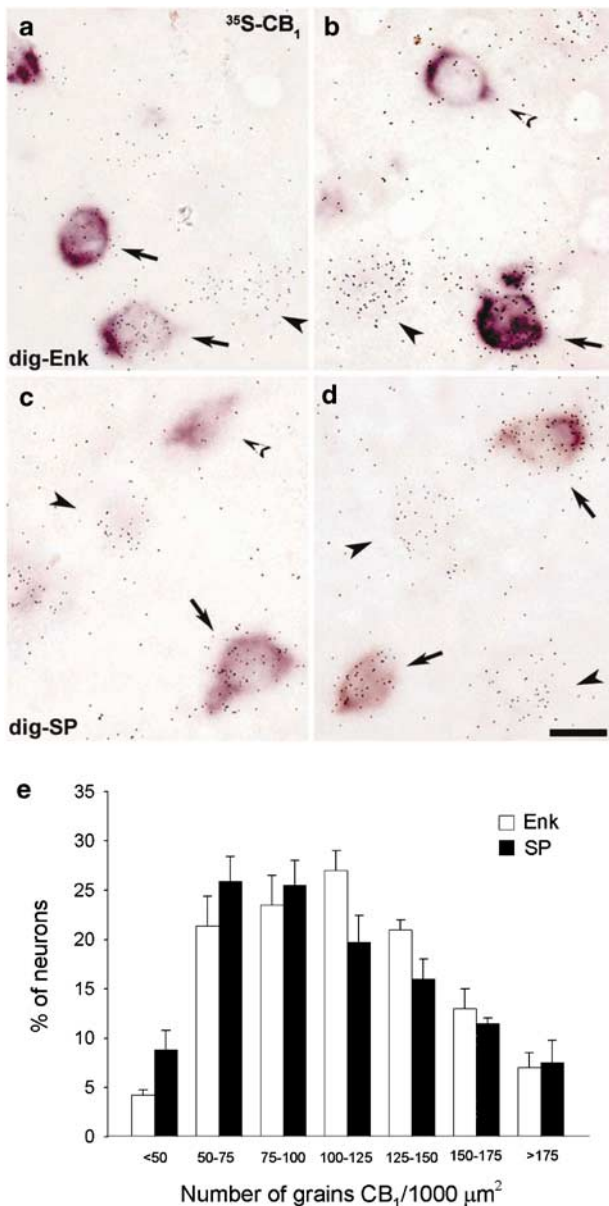
**Figure 1** Distribution and expression of CB<sub>1</sub> receptor mRNA in the striatum. *In situ* hybridization with an <sup>35</sup>S-cRNA probe for the human CB<sub>1</sub> receptor in coronal sections of rat striatum. Note that the hybridization signal is not homogeneous, showing a lateromedial gradient. Scale bar, 1 mm.

quantitative analysis, a set of slides with sections from three different brains was prepared and hybridized simultaneously using a single batch of <sup>35</sup>S-cRNA probe for CB<sub>1</sub> receptor together with either Enk or SP digoxigenin-labeled probes. These slides were processed, dipped in emulsion and developed in parallel. We then counted labeled and double-labeled neurons in the dorsal striatum, which we define to include the entire caudo-putamen, excluding the nucleus accumbens. The probe for CB<sub>1</sub> receptor produced clusters of silver grains over almost all neurons in the striatum (Figures 1–3 and 5) that were substantially greater than the autoradiographic background density, indicating that the majority of striatal neurons express CB<sub>1</sub> receptors. Both types of striatal projection neurons, Enk- and SP-expressing, were labeled with approximately similar signal intensity (Figure 2a) and the CB<sub>1</sub> receptor silver grain distribution had a Gaussian shape in both populations (Figure 2b).

Digoxigenin-labeled probes are less sensitive than <sup>35</sup>S-labeled probes, thus we confirmed that CB<sub>1</sub> receptors are expressed in both types of striatal projection neurons by repeating the dual hybridization experiments using digoxigenin label for CB<sub>1</sub> receptors and radioactivity for Enk and SP. The results of these experiments were consistent with the results described above (Figure 3). Therefore, we conclude that CB<sub>1</sub> receptors are coexpressed with dopamine D<sub>1</sub> receptors in SP neurons and with D<sub>2</sub> receptors in Enk neurons.

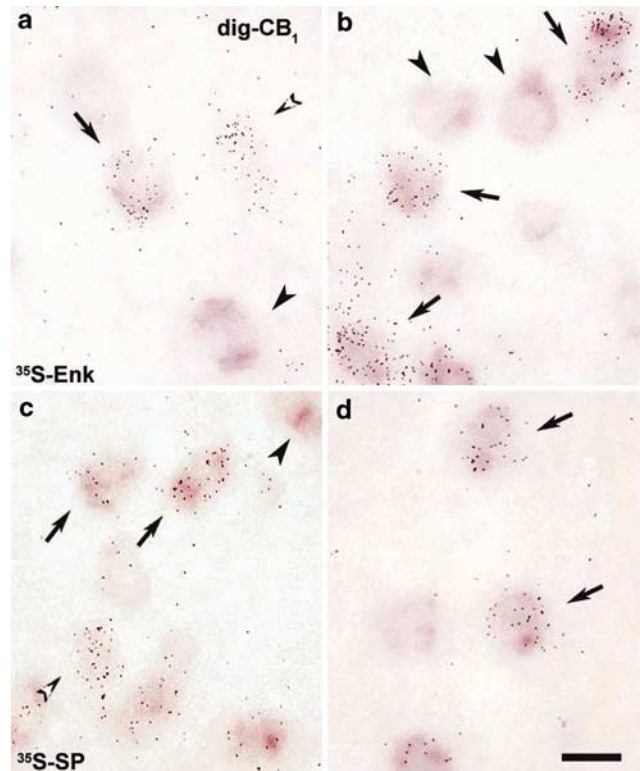
To determine whether CB<sub>1</sub> receptor expression is more prominent in direct or indirect striatal pathway neurons, we





**Figure 2** (a–d) Expression of CB<sub>1</sub> receptors in striatal projection neurons. Double *in situ* hybridization with a <sup>35</sup>S-cRNA probe for the human CB<sub>1</sub> receptor (detected by silver grains) in combination with digoxigenin-labeled probes for Enk and SP, markers of striatal projection neurons (detected by a blackish precipitate). (a, b) Arrows indicate neurons double-labeled for CB<sub>1</sub> receptors and Enk. (c, d) Arrows indicate neurons double-labeled for CB<sub>1</sub> receptors and SP. Note that CB<sub>1</sub> receptors are expressed in both Enk- and SP-positive neurons, although not all Enk-positive or SP-positive neurons expressed CB<sub>1</sub> receptors. Arrowheads indicate CB<sub>1</sub> + / Enk- in (a and b), and CB<sub>1</sub> + / SP- in (c and d). White arrowheads indicate neurons expressing only Enk in (a and b), or SP in (c and d). Scale bar, 10 μm. (e) Percentage of Enk- and SP-containing neurons with different degrees of CB<sub>1</sub> receptor labeling as measured by the number of silver grains present. Note that silver grain distribution is similar in the two populations of neurons; however, the percentage of SP-containing neurons was always higher than that of Enk neurons for each level of CB<sub>1</sub> receptor signal intensity.

conducted studies quantifying the percentage of <sup>35</sup>S-CB<sub>1</sub>-positive neurons expressing enkephalin and the percentage of <sup>35</sup>S-CB<sub>1</sub>-positive neurons expressing substance P. These studies were carried out in three different animals, with two



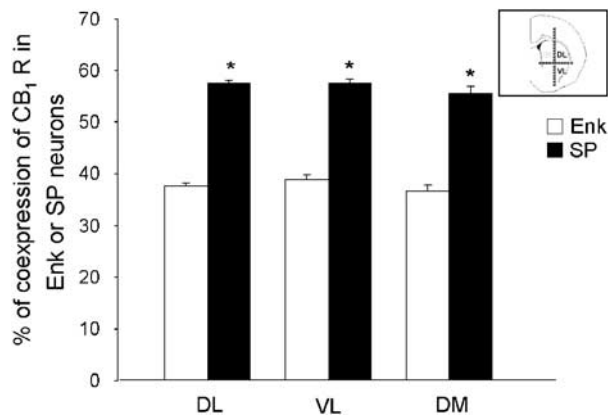
**Figure 3** Reverse labeling of Enk and SP cells for the expression of CB<sub>1</sub> receptors to further demonstrate that CB<sub>1</sub> receptors are expressed in both Enk- and SP-containing striatal projection neurons. Double *in situ* hybridization with a digoxigenin-labeled probe for the human CB<sub>1</sub> receptor (detected by a blackish precipitate) and <sup>35</sup>S-labeled riboprobes to detect Enk and SP (silver grains). Samples of neurons double-labeled for CB<sub>1</sub> receptor and Enk are shown in (a and b), and for CB<sub>1</sub> receptor and SP are shown in (c and d), indicated by arrows. Note that not all CB<sub>1</sub> receptors-containing neurons expressed Enk (a and b), or SP (c and d), as indicated by arrowheads. White arrowhead in (a) indicates an Enk-positive neuron lacking CB<sub>1</sub> receptor signal. Scale bar, 10 μm.

coronal sections from each animal. Between 2000 and 2500 CB<sub>1</sub>-receptor-positive neurons were counted in each striatum. Pairwise comparisons revealed that about 40% of all CB<sub>1</sub> receptor expressing neurons in the striatum were Enk-positive and about 60% were SP-positive. Similar percentages were found in all the striatal territories studied: dorsolateral, ventrolateral, and dorsomedial, in spite of the dorsomedial gradient in CB<sub>1</sub> receptor expression (Figure 4). Since there are equal number of Enk- and SP-positive neurons in the striatum (Bolam *et al*, 2000), these results indicate that CB<sub>1</sub> receptors are more widely coexpressed with dopamine D<sub>1</sub> receptors than with D<sub>2</sub> receptors in striatal projection neurons, regardless of the CB<sub>1</sub> receptor expression gradient ( $p < 0.001$  Student's *t*-test). We also quantified coexpression in experiments where the CB<sub>1</sub> receptor probe was labeled with digoxigenin and the neuropeptides were labeled with <sup>35</sup>S, yielding nearly identical results (data not shown).

### Expression of CB<sub>1</sub> Receptors in Molecularly Identified Striatal Interneurons

To determine whether CB<sub>1</sub> receptors in the striatum are expressed in the interneurons and if so, in which



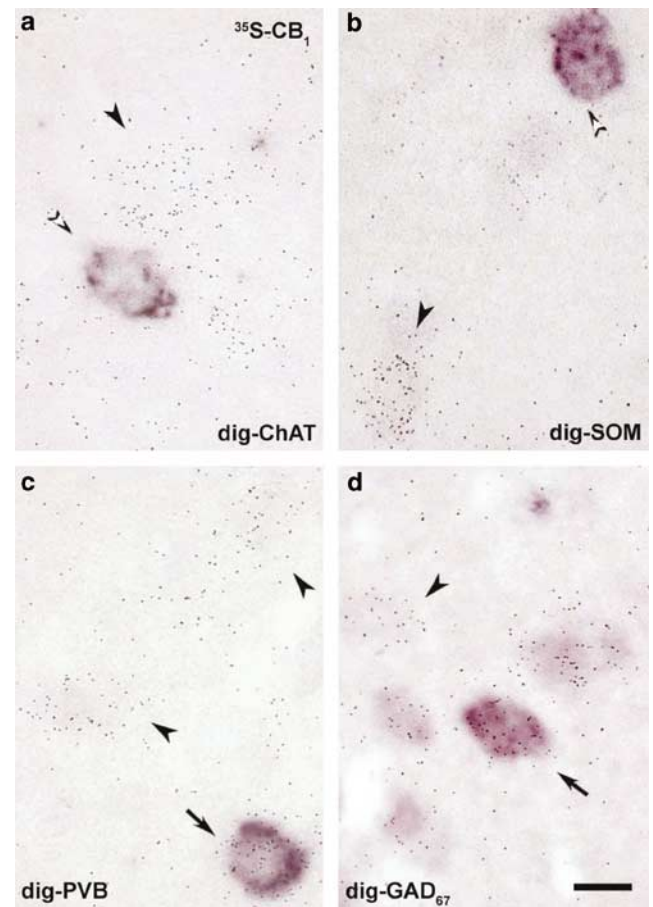


**Figure 4** Quantification of striatal projection neurons expressing CB<sub>1</sub> receptors. Histograms illustrate the percentage of CB<sub>1</sub> receptor-containing neurons expressing Enk (marker for striopallidal neurons) or SP (marker for striatonigral neurons) in different striatal regions, dorsolateral (DL), dorsomedial (DM), and ventrolateral (VL). Note that about 40% of neurons that express CB<sub>1</sub> receptors are indirect striatal projection neurons (labeled with Enk), while the other 60% are direct striatal projection neurons (marked with SP). \**p* < 0.05 vs Enk-labeled neurons.

subpopulation, we conducted dual-label hybridization experiments with <sup>35</sup>S-labeled riboprobe for CB<sub>1</sub> receptor in combination with digoxigenin-labeled riboprobes for four striatal interneuronal markers: Som, PVB, ChAT, and GAD67. For quantitative analysis, a set of slides representing material from three or four different brains was prepared and hybridized simultaneously using a single batch of <sup>35</sup>S-cRNA probe for CB<sub>1</sub> receptor together with each of the four digoxigenin-labeled riboprobes. These slides were processed in parallel, as described above. Microscopic analysis revealed that CB<sub>1</sub> receptors are expressed in PVB- and GAD67-containing interneurons, with a signal intensity similar to that seen in the projection neurons (Figure 5). The majority of these two types of interneurons expressed CB<sub>1</sub> receptors, independent of their location within the striatum. We observed a lateromedial gradient for CB<sub>1</sub> receptors and for PVB, with more double-labeled cells present in the lateral striatum. Neither cholinergic nor somatostatinergic interneurons expressed CB<sub>1</sub> receptors: we did not find any ChAT- or SOM-positive neurons that were also positive for CB<sub>1</sub> receptor in any of the hemispheres examined.

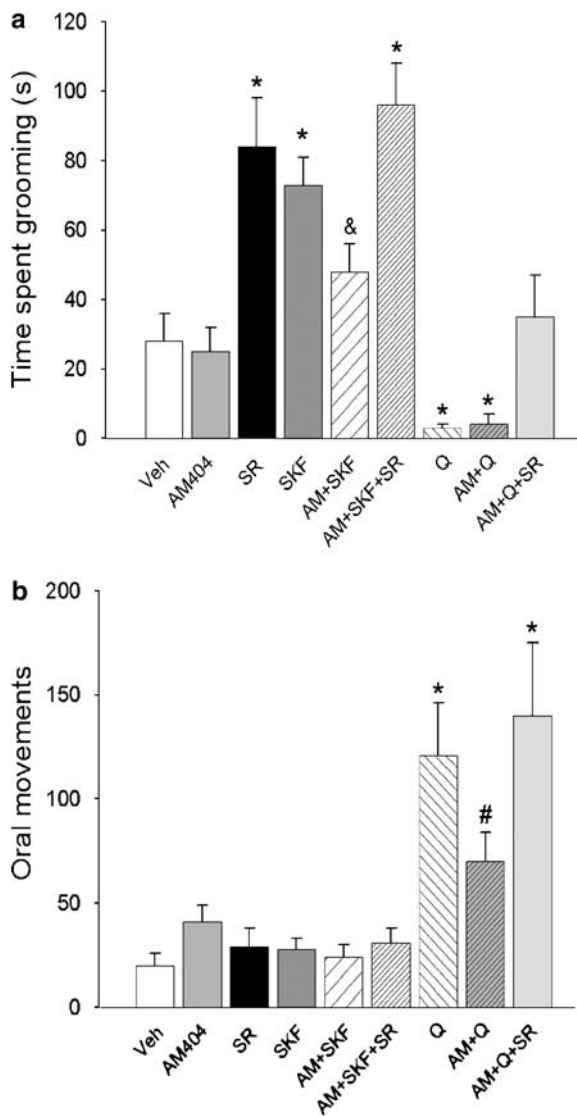
### The Anandamide Uptake Blocker, AM404, Reduces D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> Receptor-Mediated Grooming, and Oral Responses

To investigate the functional significance of the anatomical colocalization of D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> dopamine receptors with CB<sub>1</sub> receptors in the striatum, we studied the effect of increasing cannabinoid tone on behaviors mediated by D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors. Previous studies have shown that the D<sub>1</sub> receptor agonist SKF38393 increases grooming, while treatment with quinpirole, a D<sub>2</sub> preferred agonist, markedly reduced this response (Molloy and Waddington, 1987). We used the anandamide uptake blocker AM404 to elevate endogenous extracellular cannabinoid levels. AM404 has been shown to increase levels of both major endogenous cannabinoids: anandamide (Beltramo *et al*, 1997, 2000), and 2-AG



**Figure 5** High-power photomicrographs illustrating the expression of CB<sub>1</sub> receptors in striatal interneurons. Double *in situ* hybridization with an <sup>35</sup>S-cRNA probe for the human CB<sub>1</sub> receptor (detected by silver grains) in combination with digoxigenin-labeled probes (blackish precipitate) for (a) choline acetyl transferase (ChAT); (b) somatostatin (SOM); (c) parvalbumine (PVB); or (d) glutamic acid decarboxylase 67 kD a (GAD<sub>67</sub>). Note that CB<sub>1</sub> receptor mRNA is expressed in PVB and in GAD<sub>67</sub> interneurons, but cholinergic or somatostatin containing neurons do not express CB<sub>1</sub> receptors. Arrows indicate neurons expressing CB<sub>1</sub> receptors and PVB (c) or CB<sub>1</sub> receptors and GAD<sub>67</sub> (d). Arrowheads indicate neurons positive for CB<sub>1</sub> receptors and negative for peptides. White arrowheads indicate interneurons negative for CB<sub>1</sub> receptors and positive for ChAT in (a) or for SOM in (b) scale bar, 10 μm.

(Bisogno *et al*, 2001). AM404 elicited a significant reduction in SKF38393-induced grooming but had no effect on quinpirole-induced reduction of grooming behavior (Figure 6a). These results indicate that increased anandamide levels impact grooming behavior after D<sub>1</sub> but not after D<sub>2</sub> receptor stimulation, suggesting that CB<sub>1</sub> receptors may have an inhibitory role in this complex motor sequence mediated by dopamine D<sub>1</sub> receptors. The inhibitory effect of AM404 was reversed by the cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor antagonist SR141716A, which increased grooming behavior. SR141716A also reverses the quinpirole effects on grooming by antagonizing the CB<sub>1</sub> receptor-mediated inhibition of dopamine D<sub>1</sub> receptors-mediated actions (Figure 6a). In addition, the cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor agonist HU-210 suppresses grooming induced by SKF38393 (Table 1), again confirming the inhibitory role of this cannabinoid receptor on dopamine D<sub>1</sub> receptor-induced grooming.



**Figure 6** Pretreatment with anandamide uptake blocker AM404 counteracts dopamine D<sub>1</sub> or D<sub>2</sub> receptor-mediated behaviors. (a) Duration of grooming behaviors following administration of the dopamine D<sub>1</sub> receptor agonist SKF38393 (SKF, 5 mg/kg) or dopamine D<sub>2</sub> receptor agonist quinpirole (Q, 1 mg/kg), with or without pretreatment with AM404 (AM, 10 mg/kg) or the CB<sub>1</sub> receptor antagonist SR141716A (1 mg/kg). (b) Incidence of oral movements following administration of quinpirole (1 mg/kg) or SKF38393 (5 mg/kg), with or without pretreatment with AM404 (10 mg/kg) or SR141716A (1 mg/kg). \* $p < 0.01$  vs vehicle-treated animals; & $p < 0.05$  vs SKF; # $p < 0.05$  vs quinpirole and vehicle,  $n = 8$  (Newman-Keuls' test).

We also examined oral movements, which are significantly increased following quinpirole treatment in rats (Figure 6b;  $p < 0.05$ ). AM404 and SKF81297 given alone or together had no effect on the basal level of oral movements, indicating that this behavior is regulated by the activation of dopamine D<sub>2</sub> receptors (Figure 6b). Interestingly, a 15-min pretreatment with AM404 significantly reduced the induction of oral movements by quinpirole. The inhibitory effect of AM404 was reversed by the cannabinoid receptor antagonist SR141716A (Figure 6b) and mimicked by the cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor agonist HU-210 (Table 1). Taken together, these results

**Table 1** The Cannabinoid CB<sub>1</sub> Receptor Agonist HU-210 Blocks Both Dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> Receptor-Mediated Behaviours through the Activation of Cannabinoid CB<sub>1</sub> Receptors

	Time spent grooming (s)	Oral movements
Vehicle	28 ± 8	19 ± 5
HU-210 (HU), 20 µg/kg	5 ± 4*	3 ± 3*
SR141716A (SR), 1 mg/kg	84 ± 14*	29 ± 9
SKF38393 (SKF), 5 mg/kg	73 ± 10*	28 ± 5
HU+SKF	18 ± 9&	9 ± 3*
HU+SKF+SR	36 ± 10	21 ± 4
Quinpirole (Q), 1 mg/kg	3 ± 1*	121 ± 25*
HU+Q	0 ± 0*	30 ± 12
HU+Q+SR	20 ± 12	76 ± 10 <sup>#</sup>

Data represent the means ± SEM of at least 8 animals per group.

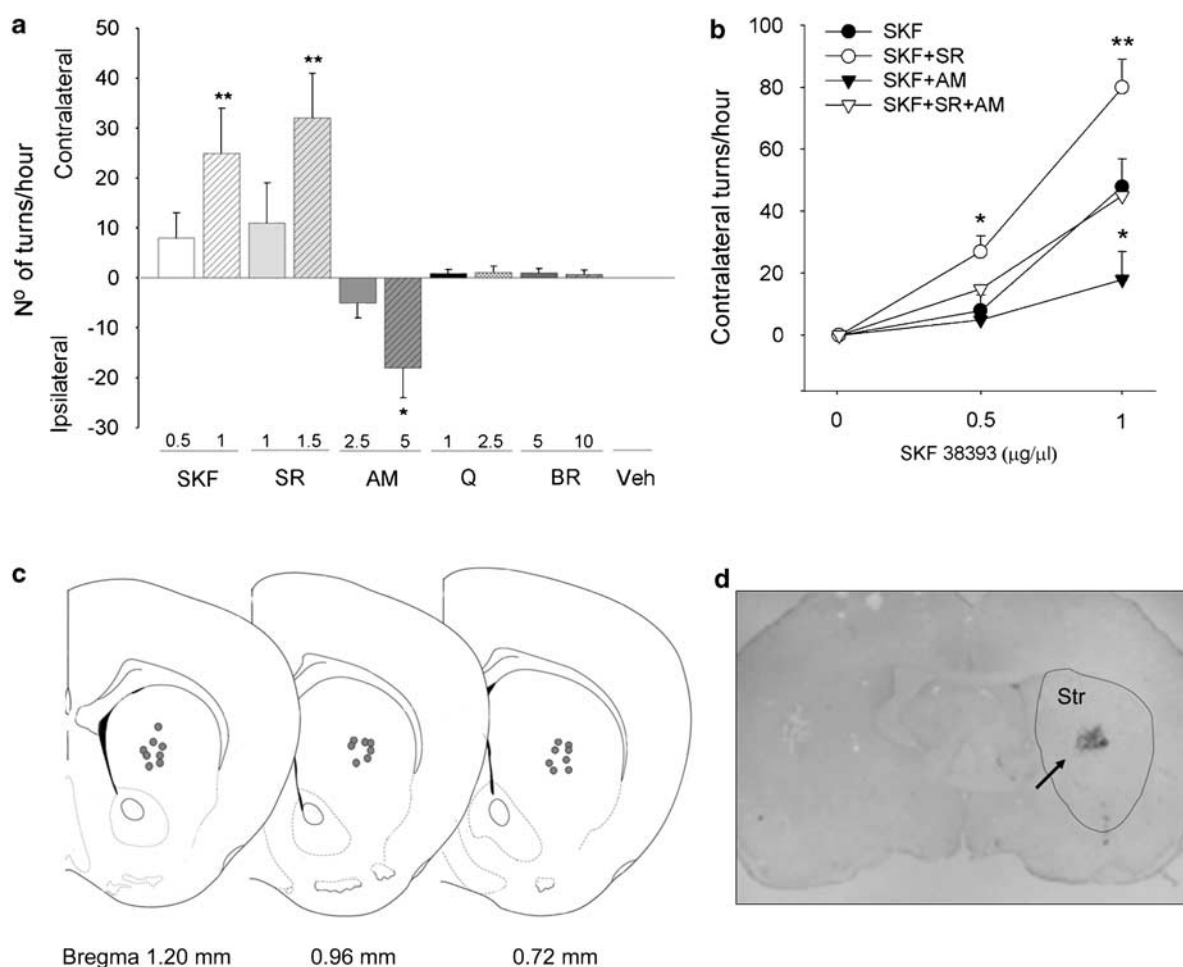
\* $p < 0.05$  vs vehicle; # $p < 0.05$  vs quinpirole and vs vehicle; & $p < 0.05$  vs SKF.

indicate that CB<sub>1</sub> receptors have an inhibitory effect on D<sub>2</sub>R-mediated oral behavior in rats.

### Opposing Effects of Cannabinoids and Dopaminergic Agents on Rotation

ANOVA indicated significant dose effects after intrastriatal infusion of SKF38393 ( $F(2, 29) = 45$ ,  $p < 0.01$ ), SR141716A ( $F(2, 29) = 88$ ,  $p < 0.01$ ), and AM404 ( $F(2, 29) = 65$ ,  $p < 0.01$ ). Thus, as it has been shown previously, intrastriatal infusion of either SKF38393, a D<sub>1</sub> receptor agonist, or SR141716A, a specific CB<sub>1</sub> receptor antagonist, significantly increased contralateral turns ( $p < 0.01$ , Figure 7a). By contrast, intrastriatal infusion of AM404 dose-dependently increased ipsilateral turns ( $p < 0.05$  vs vehicle-treated animals), while neither dose of quinpirole (1 or 2.5 µg/µl) or bromocriptine (5 and 10 µg/µl) had any effect on turning behavior. These data indicate that motor function in the injected striatum was increased after D<sub>1</sub> receptor agonism or CB<sub>1</sub> receptor antagonism, while AM404, an indirect CB<sub>1</sub> agonist, causes a motor depression indicated by the direction (ipsilateral) and number of turns. Activation of D<sub>2</sub> receptors with either quinpirole or bromocriptine does not affect rotation (Figure 7a).

To investigate whether the cannabinoid system can also modify turning behavior induced by dopamine agonists, we increased or decreased CB<sub>1</sub> receptor activity and examined the effect on rotation induced by intrastriatal injection of the dopaminergic agent SKF38393 (we did not use quinpirole or bromocriptine since they had no independent effects on rotation). Two-way ANOVA revealed a significant interaction effect of SKF38393 in combination with cannabinoid ligands ( $F(6, 72) = 34.3$ ,  $p < 0.01$ ). Pretreatment with the CB<sub>1</sub> receptor antagonist SR141716A (1.5 µg/µl) 5 min before intrastriatal injection of SKF38393 results in potentiation of contralateral turns induced by SKF38393 alone. This potentiation occurred at 1 µg/µl SKF38393 ( $p < 0.01$  vs either SR141716A or SKF38393 alone; Figure 7b). By contrast, pretreatment with AM404 (5 µg/µl) significantly reduced contralateral turning induced by 1 µg/µl SKF38393 ( $p < 0.05$  vs either AM404 or SKF38393 alone; Figure 7b). This effect was blocked when SR141716A



**Figure 7** Effect of CB<sub>1</sub> receptor ligands on rotational behaviors following intrastriatal administration of D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptor agonists. (a) Rotational behavior (expressed as number of contralateral or ipsilateral turns per hour) in rats after intrastriatal injection of SKF38393 (SKF), SR141716A (SR), AM404 (AM), quinpirole (Q) or bromocriptine (BR) alone. (b) Rotational behavior following coadministration of dopamine agonists and drugs that modulate CB<sub>1</sub> receptor activity. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM, \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01 vs vehicle in (a) or vs SKF38393 alone in (b) (Student's *t*-test),  $n$  = 8–10. Indicated doses are expressed in  $\mu$ g/ $\mu$ l. (c) The locations of infusions into left striatum are indicated on schematic sections taken from Paxinos and Watson (2005). Distance to Bregma is indicated. (d) Representative photo of an injection site in a coronal brain section stained with Nissl technique (the border of the nucleus is drawn with a dashed line). We discarded all data from animals in which histology revealed that the cannula tip was located outside the striatum. Str, striatum.

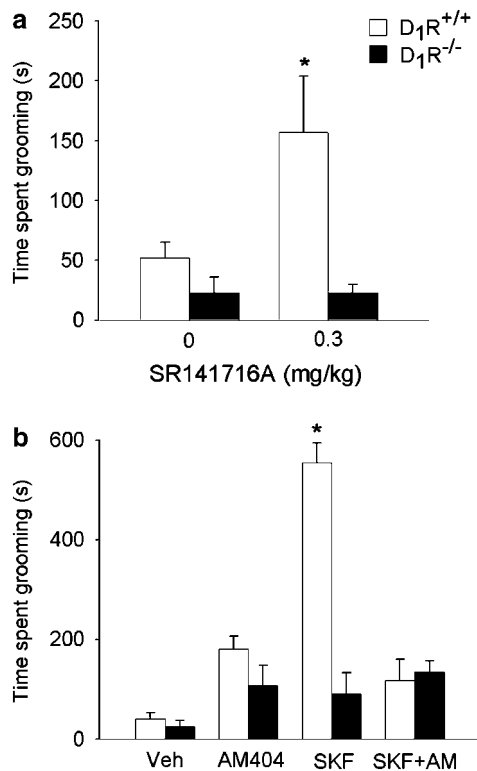
(1.5  $\mu$ g/ $\mu$ l) was injected before AM404 (Figure 7b). Thus D<sub>1</sub> receptor function is enhanced by blockade of CB<sub>1</sub> receptors and reduced by increasing concentration of the endogenous CB<sub>1</sub> receptor agonist anandamide through AM404 infusion. The effect of AM404 seems to be mediated by CB<sub>1</sub> receptors since it is blocked by SR141716A.

For all experiments involving intrastriatal injection, we confirmed the injection site histologically and only those animals where the injection site was found to be correct were analyzed. Figure 7c illustrates the central cannula tip location in the left striatum, and Figure 7d shows a representative coronal section stained with the Nissl technique. Inspection of brain tissues revealed evidence of a small lesion and gliosis at the site of injection, although surrounding tissue was generally intact.

### Studies in Wild-Type and Dopamine D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>

To provide additional evidence for a mutual inhibitory interaction between dopamine D<sub>1</sub> and cannabinoid CB<sub>1</sub>

receptors, we examined behavior in dopamine D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> mice. Rats and mice have a similar ratio of colocalization of mRNAs for CB<sub>1</sub>/D<sub>1</sub> and CB<sub>1</sub>/D<sub>2</sub> (Ana B Martín, Oscar Ortiz and Rosario Moratalla, unpublished observations). Blocking CB<sub>1</sub> receptors with SR141716A enhanced the duration of grooming in wild-type mice ( $p$  < 0.01), but had no effect on grooming in dopamine D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> (Figure 8a). This indicates that the effect of SR141716A on grooming behavior is mediated by D<sub>1</sub> receptors, probably due to release of inhibitory endocannabinoid tone that modulates endogenous dopamine D<sub>1</sub> receptor-mediated behaviors. The D<sub>1</sub> agonist SKF81297 enhanced grooming in wild-type mice ( $p$  < 0.01), but had no effect on grooming in dopamine D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>, confirming the selectivity of SKF81297 for D<sub>1</sub> receptor. AM404 had no significant effect on grooming in wild type or D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> mice. Confirming the data shown in Figure 6, AM404 reduced the effect of SKF81297 in wild-type animals. There was no effect of either of these drugs alone or together in D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> mice (Figure 8).



**Figure 8** Cannabinoid modulation of grooming in wild-type mice is dependent on D<sub>1</sub> receptors. (a) Administration of the cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor antagonist SR141716A (SR, 0.3 mg/kg) enhanced grooming behavior in wild-type mice, but not in D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> mice. (b) As expected, administration of the dopamine D<sub>1</sub> receptor agonist SKF81297 (5 mg/kg) enhanced grooming behavior in wild-type mice and this response was reduced by the anandamide uptake blocker AM404. Neither drug had any effect in D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> mice. \**p* < 0.01 vs vehicle, D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> mice and SKF + AM-treated animals, *n* = 8, Newman-Keuls.

## DISCUSSION

This study provides evidence that the endogenous cannabinoid system is a relevant negative modulator of dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptor-mediated behaviors through its actions on striatal neurons expressing dopamine receptors. The double-hybridization data presented in this study demonstrate that both types of striatal projection neurons as well as some interneurons in the striatum express and synthesize CB<sub>1</sub> receptors. The distribution of CB<sub>1</sub> receptors in the striatum showed a lateromedial gradient, confirming previous results (Herkenham *et al*, 1990, 1991; Tsou *et al*, 1998; Hermann *et al*, 2002; Julián *et al*, 2003). In addition, the present study reveals that the extent of CB<sub>1</sub> receptor mRNA expression is different in direct and indirect striatal output pathways. Our quantitative studies indicate that approximately 40% of striatal cells expressing CB<sub>1</sub> receptors are dopamine D<sub>2</sub> receptor-containing indirect projection neurons, and the remaining 60% are D<sub>1</sub> receptor-containing direct projection neurons. The present study also showed that CB<sub>1</sub> receptors are expressed by PVB and GAD67 interneurons, which are found primarily in close proximity to the cortex. Chemical stimulation of the cortex activates these interneurons, inducing expression of transcription factor genes (Berretta *et al*, 1999). Curiously enough, PVB

and GAD67 interneurons express dopamine D<sub>2</sub> (Rivera *et al*, 2002a), but not D<sub>1</sub> receptors, suggesting that interaction between endocannabinoids and the dopamine system in the cortex could be via dopamine D<sub>2</sub> receptors on striatal interneurons. PVB neurons also express D<sub>5</sub> receptors (Rivera *et al*, 2002b), which are activated by D<sub>1</sub> receptor ligands.

The colocalization of CB<sub>1</sub> receptors with both dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors indicates that these receptors may interact, potentially modifying their respective functions with important behavioral and pharmacological consequences. Supporting this notion, there are several studies suggesting the interaction between CB<sub>1</sub> receptors and dopamine D<sub>2</sub> receptors at the cellular level (Glass and Felder, 1997; Kearn *et al*, 2005). Previous reports have demonstrated a general inhibitory effect of exogenous cannabinoids on dopamine-mediated behaviors (Rodríguez de Fonseca *et al*, 1998). Activation of CB<sub>1</sub> receptor in the striatum is associated with a general inhibition of motor behaviors, resulting in long-term changes in striatal synaptic plasticity (Ronesi *et al*, 2004). However, there has been little information on the specific functional neuroanatomy of these interactions. We assessed some of the behavioral results of these putative interactions. Striatal dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors are critical for striatal control of motor function. Neurons expressing D<sub>1</sub> receptors form the direct pathway, which projects to internal globus pallidus and substantia nigra, while neurons expressing D<sub>2</sub> receptors make up the indirect pathway, projecting to external globus pallidus (McKenzie *et al*, 1984; Paul *et al*, 1992; O'Connor, 1998; Nicola *et al*, 2000; Svenningsson *et al*, 2000; Onn *et al*, 2000). Dopamine is a relevant modulator of striatal excitatory inputs from the cortex, generally facilitating motor behavior (initiation, sequencing, and ending of movement, Hauber, 1998). In addition, there are several behaviors that can be elicited by specific stimulation of either dopamine D<sub>1</sub> or D<sub>2</sub> receptors. These behaviors can be used as a read-out for functional evaluation of the different striatofugal pathways (Aldridge and Berridge, 1998) and their modulation by the endocannabinoid system. In rodents, dopamine D<sub>1</sub> receptor stimulation elicits complex motor sequencing such as grooming behavior, while stimulation of dopamine D<sub>2</sub> receptors enhances horizontal locomotion and produces stereotypical oral movements. In the present study, we selected grooming and oral stereotypies as read-out behaviors for dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptor stimulation, respectively (Giuffrida *et al*, 1999; Molloy and Waddington, 1984; Starr and Starr, 1986a, b).

It is generally accepted that the endocannabinoid system in the basal ganglia plays a key role in adjusting synaptic transmission within striatal synapses, acting as a retrograde messenger on glutamatergic or gabaergic inputs, or directly modulating postsynaptic signal transduction at dopamine receptors (Glass and Felder, 1997; Mato *et al*, 2004; Rodríguez de Fonseca *et al*, 1998). Supporting this hypothesis, pharmacological stimulation of both dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors seems to enhance anandamide production in the basal ganglia, possibly triggering negative feedback regulation of dopamine effects (Ferrer *et al*, 2003; Giuffrida *et al*, 1999). This inhibitory role on synaptic transmission is reflected in cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor-

mediated inhibition of dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptor-mediated behaviors (Rodríguez de Fonseca *et al*, 1994), and the present study confirms this negative interaction on several behavioral responses. To explore the effects of endogenous cannabinoids (anandamide and 2-arachidonylglycerol), we used AM404 to block reuptake, effectively increasing their concentrations (Beltramo *et al*, 1997, 2000; Bisogno *et al*, 2001). We found that indirect activation of CB<sub>1</sub> receptors by AM404 inhibits grooming, a dopamine D<sub>1</sub> receptor-mediated response, suggesting negative regulation of D<sub>1</sub> receptor responses by endogenous cannabinoids via CB<sub>1</sub>. These data showed that dopamine D<sub>2</sub> receptors also appear to impact grooming behavior, because the D<sub>2</sub> receptor agonist quinpirole reduced grooming behavior, pointing to opposite modulation of this behavior by D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors, as seen previously (Starr and Starr, 1986a, b). Modulation of endocannabinoid levels by AM404 did not apparently influence the inhibitory activity of quinpirole in grooming, possibly due to an already floor effect reached by quinpirole. However, administration of SR141716A reverses the suppression of grooming induced by the combined administration of quinpirole and AM404, clearly indicating the interaction of CB<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors, mutually opposing to D<sub>1</sub> receptor-mediated facilitation of self-grooming.

Stereotypical oral movements are a characteristic response to D<sub>2</sub> stimulation in rodents, and they seem to be modulated at the striatal level (McPherson and Marshall, 1996; Davidkova *et al*, 1998). Confirming previous results, we found that D<sub>1</sub> stimulation did not affect oral responses, while D<sub>2</sub> agonist clearly induced oral stereotypies in rats. Cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor stimulation blocked D<sub>2</sub>-induced oral stereotypies. This finding points to a negative interaction between D<sub>2</sub> and CB<sub>1</sub> receptors in the striatum with respect to oral stereotypies, as has been described for horizontal locomotion (Giuffrida *et al*, 1999). This has important therapeutic implications since oral stereotypies are side-effects of prolonged dopaminergic stimulation in humans including neuroleptic treatment for psychosis and levodopa therapy for Parkinson's disease. Our results suggest that CB<sub>1</sub> agonism has therapeutic potential for reducing the incidence of these abnormal oral responses. In this context, there is evidence that drugs that enhance the activity of the endocannabinoid system may have the capacity to suppress or prevent unwanted dyskinesias in Parkinsonian patients (Ferrer *et al*, 2003), without affecting the beneficial D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> effects of L-DOPA.

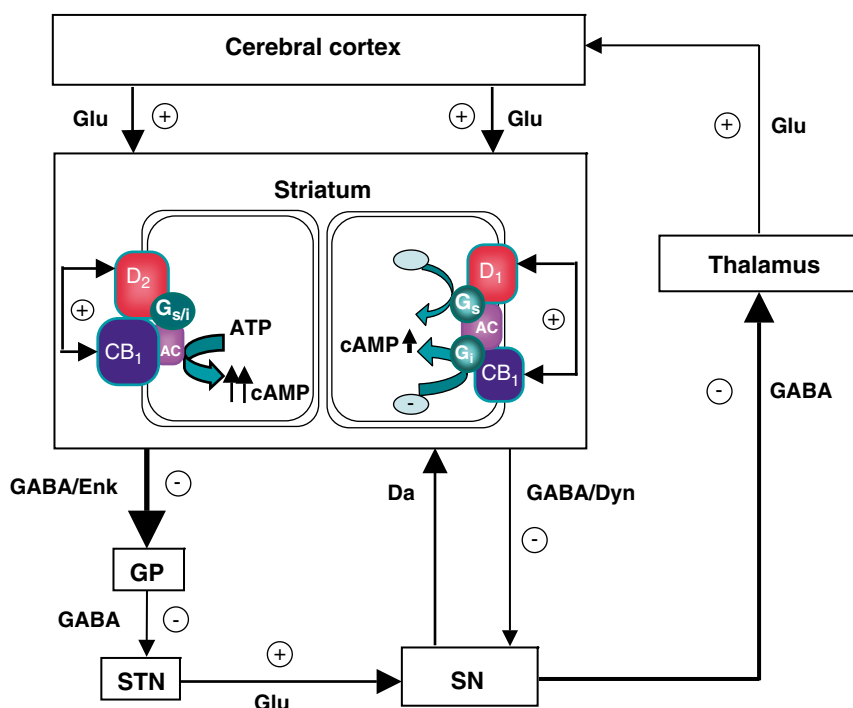
A potential contribution of other targets of anandamide and AM404 (eg the vanilloid VR1 receptor) to the inhibition of dopamine-mediated behaviors cannot be excluded (De laigo *et al*, 2004; Tzavara *et al* 2006). However, we obtained pharmacological confirmation of the involvement of the CB<sub>1</sub> receptor in AM404 action on dopamine-mediated behaviors. Administration of the CB<sub>1</sub> agonist HU-210 suppressed both D<sub>1</sub> receptor-mediated grooming and D<sub>2</sub> receptor-mediated oral stereotypies. Furthermore, the inhibitory actions of AM404 and HU-210 were reversed by administration of the CB<sub>1</sub> receptor antagonist SR141716A. Thus, although activation of vanilloid receptors may exert antidopaminergic actions, our results confirm that the effects we see are mediated by cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors.

At the local striatal level, our results revealed that intrastriatal D<sub>1</sub> (but not D<sub>2</sub>) receptor activation enhanced

motor function, leading to contralateral rotations. From a functional point of view, stimulation of D<sub>1</sub> receptors would resemble physiological effects of dopamine, leading to a net excitation of neurons of the motor cortex (Löschmann *et al*, 1997; Onn *et al*, 2000). In this context, D<sub>1</sub> receptor agonism in the striatum has been reported to stimulate motor function: intrastriatal administration of SKF38393 increased movements in rats (You *et al* 1994). We found that manipulating CB<sub>1</sub> function with cannabinoid ligands modified D<sub>1</sub>-induced motor responses: CB<sub>1</sub> antagonism enhanced D<sub>1</sub>-induced motor responses and CB<sub>1</sub> activation blocked them, again indicating a negative interaction between D<sub>1</sub> and CB<sub>1</sub> receptors. Although AM404 can also influence TRPV1 vanilloid receptors (Zygmunt *et al*, 2000), AM404-mediated effects on SKF-induced rotation were blocked by SR141716A, indicating that the AM404 effect is mediated by CB<sub>1</sub> receptors. As reported previously, D<sub>2</sub> stimulation with quinpirole or bromocriptine had no effect on rotation (Sañudo-Peña *et al*, 1998a). Many studies have shown that D<sub>2</sub> receptor activation only modifies turning responses in rats with unilateral striatal denervation, probably due to compensatory overexpression of D<sub>2</sub> receptors (El Banoua *et al*, 2004). In summary, intrastriatal infusion of cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor antagonist stimulates motor activation, while CB<sub>1</sub> receptor agonist inhibits it. Since activation of CB<sub>1</sub> receptor counteracts the stimulatory effects of D<sub>1</sub> receptor agonists, as shown previously (Sañudo-Peña *et al*, 1998a), the effects of CB<sub>1</sub> receptor ligands are likely to be due to their modulation of the effects of endogenous dopamine at D<sub>1</sub> receptors.

We further analyzed this relationship using dopamine D<sub>1</sub> receptor knockout (D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>) mice. In mice, as in rats, grooming is a characteristic behavior associated with selective stimulation of D<sub>1</sub> receptors (Starr and Starr, 1986a, b). Our findings confirmed that this response is activated after D<sub>1</sub> receptor stimulation, and disappears in mice lacking dopamine D<sub>1</sub> receptors. Grooming is also stimulated after CB<sub>1</sub> antagonism, and this effect is mediated by D<sub>1</sub> receptors since it does not take place in dopamine D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> mice. In addition, grooming is further enhanced after D<sub>1</sub> stimulation and CB<sub>1</sub> receptor blockade, indicating that D<sub>1</sub> and CB<sub>1</sub> receptors have opposing effects on grooming. Because we did not observe enhanced grooming in D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> mice after cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor blockade we believe that the effects of CB<sub>1</sub> receptor blockade in wild-type mice are due to baseline cannabinoid tone that inhibits dopamine D<sub>1</sub>-mediated behavior. We found that WT mice treated with AM404 have more grooming than control mice treated with vehicle, although this response is fourfold lower than that observed after D<sub>1</sub> receptor stimulation. Moreover, pretreatment with AM404 completely abolished the potent response induced by the dopamine agonist. None of these effects induced by SKF81297 were observed in D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> mice suggesting critical dependence on D<sub>1</sub> receptors. The small increase observed after AM404 in grooming behavior in both WT and D<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> mice may be related to alternative targets implicated in grooming as indicated elsewhere (ie a potential stress response induced by AM404 injection, since stress induces grooming in mice (Kalueff and Tuohimaa, 2005)).

Our study demonstrates that CB<sub>1</sub> mRNA is colocalized both with dopamine D<sub>1</sub> receptors in direct striatal projection



**Figure 9** Diagram of the basal ganglia motor circuit. This simplified diagram shows the main connections between regions in the basal ganglia motor circuit. Cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors are present on both, striatonigral gabaergic projection neurons, which also express D<sub>1</sub> receptors, and striopallidal gabaergic projection neurons, which express D<sub>2</sub> receptors. The location of CB<sub>1</sub> receptors allows the cannabinoids to modulate both afferent glutamatergic inputs into the striatum and also the efferent inhibitory outputs from the medium-spiny projection neurons. Activation of CB<sub>1</sub> and D<sub>1</sub> receptors results in a net decrease in adenylyl cyclase activity, causing a decrease in the inhibitory activity of direct striatal projection neurons, which enhances the activity of nigral neurons and results in decreased motor response. Conversely, simultaneous activation of CB<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors stimulates adenylyl cyclase, potentiating the indirect striatal pathway neurons that in turn activate neurons of the subthalamic nuclei, also resulting in decreased movement. Globus pallidus (GP); subthalamic nucleus (STN); substantia nigra (SN).

neurons and with D<sub>2</sub> receptors in indirect striatal projection neurons. This allows endogenous cannabinoids acting at CB<sub>1</sub> receptors to modulate not only the afferent glutamatergic inputs into the striatum but also the efferent inhibitory outputs of the medium spiny neurons to their projection fields in the midbrain, as shown in the diagram of the basal ganglia motor circuit (Figure 9). These data support the hypothesis that endogenous cannabinoids act through CB<sub>1</sub> receptors in the striatum to inhibit dopamine-mediated motor behaviors, including dopamine D<sub>1</sub> receptor-mediated grooming behavior, D<sub>1</sub> receptor-induced turning response, and D<sub>2</sub> receptor-induced oral stereotypies. It has been reported that CB<sub>1</sub> agonists facilitate dopaminergic activity in the nucleus accumbens (French *et al*, 1997). It may seem that this contradicts our findings, but in fact, due to the complexity of basal ganglia circuitry as shown in Figure 9, it is consistent with our results. The interaction between CB<sub>1</sub> and D<sub>1</sub> receptors in dorsal striatum decreases the inhibitory input of striatal projection neurons onto dopaminergic neurons in the VTA and SN that project to the nucleus accumbens and to the striatum, enhancing their activity.

Functional interactions between dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors, and the CB<sub>1</sub> receptor could occur due to direct receptor-receptor interaction (Kearn *et al*, 2005) or indirectly, via intracellular signaling pathways (Glass and Felder, 1997) or via effects on cells in different regions of the motor circuit. Since dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors, and the

CB<sub>1</sub> receptor all regulate adenylyl cyclase (AC), this common pathway is one likely site for interaction. Activation of CB<sub>1</sub> and D<sub>1</sub> receptors together results in a net decrease in adenylyl cyclase, causing a decrease in the inhibitory activity of direct striatal projection neurons, which enhances the activity of nigral neurons and results in decreased motor response (Figure 9). Conversely, activation of CB<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors together stimulates adenylyl cyclase (Glass and Felder, 1997), potentiating the indirect striatal pathway neurons that in turn activate neurons of the subthalamic nuclei, also resulting in decreased movement. Although this scenario is in good agreement with our results, additional work is needed to determine whether the effect of CB<sub>1</sub> R activation on D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub>-mediated behaviors is in fact mediated via the adenylyl cyclase signaling pathway. Whatever the mechanism, these data indicate that endogenous cannabinoids acting at striatal CB<sub>1</sub> receptors play a significant role in the regulation of basal ganglia motor circuits.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by MEC SAF2003-4864, SAF 2004-07762, C03/06/02/NAC, Delegación del Gobierno para el Plan Nacional Sobre Drogas and FIS (Red temática de Trastornos Adictivos, RD06/0001) CIBERNED to RM, EFE, MN, and FRF; FIS031004 PI 071073 to RM, and FIS040155 and Junta de Andalucía CVI127 to EFE.



## DISCLOSURE/CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that, except for income received from our primary employer, no financial support or compensation has been received from any individual or corporate entity over the past 3 years for research or professional service and there are no personal financial holdings that could be perceived as constituting a potential conflict of interest.

## REFERENCES

- Aldridge JW, Berridge KC (1998). Coding of serial order by neostriatal neurons: a 'natural action' approach to movement sequence. *J Neurosci* 18: 2777–2787.
- Baker D, Pryce G, Croxford JL, Brown P, Pertwee RG, Huffman JW *et al* (2000). Cannabinoids control spasticity and tremor in a multiple sclerosis model. *Nature* 404: 84–87.
- Beltramo M, Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Calignano A, Gorriti MA, Grammatikopoulos G *et al* (2000). Reversal of dopamine D<sub>2</sub> receptor responses by an anandamide transport inhibitor. *J Neurosci* 20: 3401–3407.
- Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D (1997). Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* 277: 1094–1097.
- Berretta S, Sachs Z, Graybiel AM (1999). Cortically driven Fos induction in the striatum is amplified by local dopamine D<sub>2</sub>-class receptor blockade. *Eur J Neurosci* 11: 4309–4319.
- Bisogno T, MacCarrone M, De Petrocellis L, Jarrahian A, Finazzi-Agor A, Hillard C *et al* (2001). The uptake by cells of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous agonist of cannabinoid receptors. *Eur J Biochem* 268: 1982–1989.
- Bolam JP, Hanley JJ, Booth PA, Bevan MD (2000). Synaptic organization of the basal ganglia. *J Anat* 196(Part 4): 527–542.
- Cadogan AK, Alexander SP, Boyd EA, Kendall DA (1997). Influence of cannabinoids on electrically evoked dopamine release and cyclic AMP generation in the rat striatum. *J Neurochem* 69: 1131–1137.
- Davidkova G, Zhou L-W, Morabito M, Zhang S-P, Weiss B (1998). D<sub>2</sub> dopamine antisense RNA expression vector, unlike haloperidol, produces long-term inhibition of D<sub>2</sub> dopamine-mediated behaviors without causing up-regulation of D<sub>2</sub> dopamine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 285: 1187–1196.
- De Lago E, de Miguel R, Lastres-Becker I, Ramos JA, Fernandez-Ruiz J (2004). Involvement of vanilloid-like receptors in the effects of anandamide on motor behavior and nigrostriatal dopaminergic activity: *in vivo* and *in vitro* evidence. *Brain Res* 1007: 152–159.
- El Banoua F, Caraballo I, Flores JA, Galan-Rodriguez B, Fernandez-Espejo E (2004). Effects on turning of microinjections into basal ganglia of D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> dopamine receptors agonists, and the cannabinoid CB<sub>1</sub> antagonist SR141716A in a rat Parkinson's model. *Neurobiol Dis* 16: 377–385.
- Fernandez-Espejo E, Caraballo I, Rodriguez de Fonseca F, El Banoua F, Ferrer B, Flores JA *et al* (2005). Cannabinoid CB<sub>1</sub> antagonists possess antiparkinsonian efficacy only in rats with very severe nigral lesion in experimental Parkinsonism. *Neurobiol Dis* 18: 591–601.
- Ferrer B, Asbrock N, Kathuria S, Piomelli D, Giuffrida A (2003). Effects of levodopa on endocannabinoid levels in rat basal ganglia: implications for the treatment of levodopa-induced dyskinesias. *Eur J Neurosci* 18: 1607–1614.
- French ED, Dillon K, Wu X (1997). Cannabinoids excite dopamine neurons in the ventral tegmentum and substantia nigra. *Neuroreport* 3: 649–652.
- Gerdeman G, Lovinger DM (2001). CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsolateral striatum. *J Neurophysiol* 85: 468–471.
- Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma Jr FJ *et al* (1990). D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250: 1429–1432.
- Giuffrida A, Parsons LH, Kerr TM, Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Piomelli D (1999). Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nat Neurosci* 2: 358–363.
- Glaser ST, Abumrad NA, Fatade F, Kaczocha M, Studholme KM, Deutsch DG (2003). Evidence against the presence of an anandamide transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 4269–4274.
- Glass M, Felder CC (1997). Concurrent stimulation of cannabinoid CB<sub>1</sub> and dopamine D<sub>2</sub> receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB<sub>1</sub> receptor. *J Neurosci* 17: 5327–5333.
- Gubellini P, Picconi B, Bari M, Battista N, Calabresi P, Centonze D *et al* (2002). Experimental Parkinsonism alters endocannabinoid degradation: implications for striatal glutamatergic transmission. *J Neurosci* 22: 6900–6907.
- Hauber W (1998). Involvement of basal ganglia transmitter systems in movement initiation. *Prog Neurobiol* 56: 507–540.
- Herkenham M, Lynn AB, De Costa BR, Richfield EK (1991). Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat. *Brain Res* 547: 267–274.
- Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR *et al* (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1932–1936.
- Hermann H, Marsicano G, Lutz B (2002). Coexpression of the cannabinoid receptor type 1 with dopamine and serotonin receptors in distinct neuronal subpopulations of the adult mouse forebrain. *Neuroscience* 109: 451–460.
- Julián MD, Martín AB, Cuéllar B, Rodríguez de Fonseca F, Navarro M, Moratalla R *et al* (2003). Neuroanatomical relationship between type 1 cannabinoid receptors and dopaminergic systems in the rat basal ganglia. *Neuroscience* 119: 309–318.
- Kalueff AV, Tuohimaa P (2005). Mouse grooming microstructure is a reliable anxiety marker bidirectionally sensitive to GABAergic drugs. *Eur J Pharmacol* 508: 147–153.
- Kearn CS, Blake-Palmer K, Daniel E, Mackie K, Glass M (2005). Concurrent stimulation of cannabinoid CB<sub>1</sub> and dopamine D<sub>2</sub> receptors enhances heterodimer formation: a mechanism for receptor cross-talk? *Mol Pharmacol* 67: 1697–1704.
- Keefe KA, Gerfen CR (1995). D<sub>1</sub>–D<sub>2</sub> dopamine receptor synergy in striatum: effects of intrastriatal infusions of dopamine agonists and antagonists on immediate early gene expression. *Neuroscience* 66: 903–913.
- Löschmann PA, Wüllner U, Heneka MT, Schulz JB, Kunow M, Wachtel H *et al* (1997). Differential interaction of competitive NMDA and AMPA antagonists with selective dopamine D-1 and D-2 agonists in a rat model of Parkinson's disease. *Synapse* 26: 381–391.
- Mato S, Chevalere V, Robbe D, Pazos A, Castillo PE, Manzoni OJ (2004). A single *in-vivo* exposure to delta 9-THC blocks endocannabinoid-mediated synaptic plasticity. *Nat Neurosci* 7: 585–586.
- McKenzie S, Kemm RE, Wilcock LN (1984). *The Basal Ganglia. Structure and Function*. Plenum Press: New York.
- McPherson RJ, Marshall JF (1996). Intrastriatal AP5 differentially affects behaviors induced by local infusions of D<sub>1</sub> vs D<sub>2</sub> dopamine agonists. *Brain Res* 739: 19–25.
- Molloy AG, Waddington JL (1987). Assessment of grooming and other behavioural responses to the D-1 dopamine receptor agonist SK & F 38393 and its R- and S-enantiomers in the intact adult rat. *Psychopharmacol* 92: 164–168.

- Molloy AG, Waddington JL (1984). Dopaminergic behavior stereospecifically promoted by the D-1 agonist R-SKF 38393 and selectively blocked by the D-1 antagonist SCH 23390. *Psychopharmacology* 82: 409–410.
- Moratalla R, Xu M, Tonegawa S, Graybiel AM (1996). Cellular responses to psychomotor stimulant and neuroleptic drugs are abnormal in mice lacking the D1 dopamine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 14928–14933.
- Nicola SM, Surmeier DJ, Malenka RC (2000). Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Annu Rev Neurosci* 23: 185–215.
- O'Connor WT (1998). Functional neuroanatomy of the basal ganglia as studied by dual-probe microdialysis. *Nucl Med Biol* 25: 743–746.
- Onn SP, West AR, Grace AA (2000). Dopamine-mediated regulation of striatal neuronal and network interactions. *Trends Neurosci* 23(suppl): S48–S56.
- Paul ML, Graybiel AM, David JC, Robertson HA (1992). D<sub>1</sub>-like and D<sub>2</sub>-like dopamine receptors synergistically activate rotation and c-fos expression in the dopamine-depleted striatum in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 12: 3729–3742.
- Pavón N, Martín AB, Mendiola A, Moratalla R (2006). ERK phosphorylation and FosB expression are associated with L-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian mice. *Biol Psychiatry* 59: 64–74.
- Paxinos G, Watson C (2005). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Elsevier: Amsterdam.
- Pertwee RG (1999). Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr Med Chem* 6: 635–664.
- Rivera A, Cuellar B, Giron FJ, Grandy DK, de la Calle A, Moratalla R (2002a). Dopamine D4 receptors are heterogeneously distributed in the striosomes/matrix compartments of the striatum. *J Neurochem* 80: 219–229.
- Rivera A, Alberti I, Martín AB, Narvaez JA, de la Calle A, Moratalla R (2002b). Molecular phenotype of rat striatal neurons expressing the dopamine D5 receptor subtype. *Eur J Neurosci* 16: 2049–2058.
- Rodríguez de Fonseca F, Del Arco I, Martín-Calderon JL, Gorriti MA, Navarro M (1998). Role of the endogenous cannabinoid system in the regulation of motor activity. *Neurobiol Dis* 5: 483–501.
- Rodríguez de Fonseca F, Martín Calderon JL, Mechoulam R, Navarro M (1994). Repeated stimulation of D<sub>1</sub> dopamine receptors enhances (–)-11-hydroxy- $\Delta^8$ -tetrahydrocannabinol-dimethyl-heptyl-induced catalepsy in male rats. *Neuroreport* 5: 761–765.
- Ronesi J, Gerdeman GL, Lovinger DM (2004). Disruption of endocannabinoid release and striatal long-term depression by postsynaptic blockade of endocannabinoid membrane transport. *J Neurosci* 24: 1673–1679.
- Routtenberg A (1972). Intracranial chemical injection and behavior: a critical review. *Behav Biol* 7: 601–641.
- Saáudo-Peña MC, Force M, Tsou K, Miller AS, Walker JM (1998a). Effects of intrastriatal cannabinoids on rotational behaviors in rats: interactions with the dopaminergic system. *Synapse* 30: 221–226.
- Saáudo-Peña MC, Patrick SL, Khen S, Patrick RL, Tsou K, Walker JM (1998b). Cannabinoid effects in basal ganglia in a rat model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 248: 171–174.
- Schwartz RKW, Huston JP (1996). The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research: analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Prog Neurobiol* 50: 275–331.
- Starr BS, Starr MS (1986a). Grooming in the mouse is stimulated by the dopamine D<sub>1</sub> agonist SKF 38393 and by low doses of the D<sub>1</sub> antagonist SCH 23390, but is inhibited by dopamine D<sub>2</sub> agonists, D<sub>2</sub> antagonists and high doses of SCH 23390. *Pharmacol Biochem Behav* 24: 837–839.
- Starr BS, Starr MS (1986b). Differential effects of dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> agonists and antagonists on velocity of movement, rearing and grooming in the mouse. Implications for the roles of D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors. *Neuropharmacology* 25: 455–463.
- Svenningsson P, Fredholm BB, Bloch B, Le Moine C (2000). Co-stimulation of D<sub>1</sub>/D5 and D<sub>2</sub> dopamine receptors leads to an increase in c-fos messenger RNA in cholinergic interneurons and a redistribution of c-fos messenger RNA in striatal projection neurons. *Neuroscience* 98: 749–757.
- Tsou K, Brown S, Saáudo-Peña MC, Mackie K, Walker JM (1998). Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 83: 393–411.
- Tzavara ET, Li DL, Moutsimilli L, Bisogno T, Di Marzo V, Phebus LA *et al* (2006). Endocannabinoids activate transient receptor potential vanilloid 1 receptors to reduce hyperdopaminergia-related hyperactivity: therapeutic implications. *Biol Psychiatry* 59: 508–515.
- Ungerstedt U, Arbuthnott GW (1970). Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res* 24: 486–493.
- Xu M, Moratalla R, Gold LH, Hiroi N, Koob GF, Graybiel AM *et al* (1994). Dopamine D1 receptor mutant mice are deficient in striatal expression of dynorphin and in dopamine-mediated behavioral responses. *Cell* 79: 729–742.
- You ZB, Herrera-Marschitz M, Nylander I, Gojny M, O'Connor WT, Ungerstedt U *et al* (1994). The striatonigral dynorphin pathway of the rat studied with *in vivo* microdialysis. II. Effects of dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptor agonists. *Neuroscience* 63: 427–434.
- Zygmunt PM, Chuang H, Movahed P, Julius D, Hogestatt ED (2000). The anandamide transport inhibitor AM404 activates vanilloid receptors. *Eur J Pharmacol* 396: 39–42.



## Molecular dissection of dopamine receptor signaling

Noboru Hiroi<sup>a</sup>, Ana B. Martín<sup>b</sup>, Cristina Grande<sup>b</sup>, Israel Alberti<sup>b</sup>, Alicia Rivera<sup>b</sup>,  
Rosario Moratalla<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Departments of Psychiatry and Behavioral Sciences, Albert Einstein College of Medicine, 1300 Morris Park Avenue, Bronx, NY, USA

<sup>b</sup> Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avda Dr. Arce, 37, Madrid 28002, Spain

Accepted 25 February 2002

### Abstract

The use of genetically engineered mice has provided substantial new insights into the functional organization of the striatum. Increasing evidence suggests that specific genes expressed within the striatum contribute to its functional activity. We studied the dopamine (DA) D1 receptor gene and one of its downstream targets, the transcription factor c-Fos. We have evaluated the functional interaction between the D1 and D2 DA receptor subtypes at the cellular and behavioral levels. Our results show that haloperidol, a DA D2-class receptor antagonist, activates c-Fos predominantly in enkephalin-positive striatal neurons, which project to the globus pallidus and are thought to mediate motor inhibition. Deletion of the DA D1 receptor increased the responsiveness of enkephalin neurons to haloperidol, in that haloperidol-induced increases in c-Fos and catalepsy were enhanced in D1 receptor knockout mice. These results suggest a functionally opposing role of the D1 receptor against the D2 DA-class receptors in the striatum. © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Haloperidol; Fos; Enkephalin; Catalepsy; D1; D2

### 1. Introduction

Dopamine (DA) neurons in the central nervous system are thought to play a critical role in various neurological and psychiatric disorders, including schizophrenia, Parkinson's disease, and drug addiction. Like other receptor proteins, DA receptors are located at the cell membrane, where they interact with DA, regulate specific intracellular signaling networks, and modulate the function of these neurons. Thus, the study of DA receptors has been a primary approach towards understanding the physiological functions of DA systems. A better understanding of dopaminergic function, in turn, may lead to the development of improved therapeutic approaches to treat these devastating neurological and psychiatric disorders.

When characterized by a strictly pharmacological approach, there are two major classes of DA receptor subtypes: D1-class and D2-class. Activation of D1-class receptors stimulates adenylyl cyclase, the enzyme that converts ATP to cyclic AMP. In contrast, the D2-class receptors inhibit adenylyl cyclase activity (Vallone et al., 2000). Molecular cloning studies have shown that there are actually multiple genes that comprise these two classes of receptors. The DA D1 and D5 receptors exhibit the pharmacological characteristics of the D1-class receptor, whereas the D2, D3, and D4 genes characteristics show the of D2-class receptors (Sibley and Monsma, 1992; Jaber et al., 1996). There is a high degree of homology in the genetic sequences between these two classes of receptors. However, there are also some critical structural features that differentiate them. The D1-class receptor genes lack introns, whereas the D2-class receptor genes contain introns and different splicing domains. The pharmacological differences between these two classes of receptors reside not only in the sequential differences that form the binding crevice

\* Corresponding author. Tel.: +34-91-585-4705; fax: +34-91-585-4754.

E-mail address: moratalla@cajal.csic.es (R. Moratalla).

# Endogenous Dopamine Amplifies Ischemic Long-Term Potentiation via D1 Receptors

Emilia Saulle, MD; Diego Centonze, MD; Ana B. Martín, PhD; Rosario Moratalla, PhD;  
Giorgio Bernardi, MD; Paolo Calabresi, MD

**Background and Purpose**—Several observations indicate that, during energy deprivation, endogenous dopamine may become neurotoxic. Accordingly, the nucleus striatum is a preferential site of silent infarcts in humans, and experimental ischemia caused by homolateral carotid occlusion selectively damages this dopamine-enriched brain area. In an attempt to clarify how dopamine takes part in ischemia-induced neuronal damage, we performed in vitro electrophysiological recordings from neurons of the nucleus striatum.

**Methods**—Intracellular recordings with sharp microelectrodes were performed from corticostriatal slices. Slices were obtained from both rats and wild-type and dopamine D1 receptor-lacking mice. In some experiments, the striatum was unilaterally denervated by injecting the dopamine-specific neurotoxin 6-hydroxydopamine in the homolateral substantia nigra. Dopamine agonists and antagonists, as well as drugs targeting the intracellular cascade coupled to dopamine receptor stimulation, were applied at known concentrations.

**Results**—Manipulation of the dopamine system failed to affect the membrane depolarization of striatal neurons exposed to combined oxygen and glucose deprivation of short duration, but it reduced the amplitude of postischemic long-term potentiation (LTP) expressed at corticostriatal synapses. In particular, pharmacological blockade or genetic inactivation of D1/cAMP/protein kinase A pathway prevented the long-term increase of the excitatory postsynaptic potential (EPSP) amplitude caused by a transient ischemic episode, while it failed to prevent the increase of the EPSP half-decay coupled to ischemic LTP.

**Conclusions**—The present data suggest that endogenous dopamine, via D1 receptors, selectively facilitates the expression of ischemic LTP on the AMPA-mediated component of the EPSPs, while it does not alter the expression of this form of synaptic plasticity on the *N*-methyl-D-aspartate-mediated component of corticostriatal synaptic potentials. Understanding the cellular and molecular mechanisms of ischemia-triggered excitotoxicity offers hope for the development of specific treatments able to interfere with this pathological process. (*Stroke*. 2002;33:2978-2984.)

**Key Words:** apoptosis ■ electrophysiology ■ energy metabolism ■ excitotoxicity ■ neuronal plasticity ■ synapses

Among the various neuronal subtypes of the brain, striatal spiny neurons are particularly vulnerable to ischemia.<sup>1-4</sup> Abnormal release of excitatory amino acids is proposed to be a critical factor for neuronal death during ischemia,<sup>5,6</sup> and, according to this hypothesis, in the ischemic striatum glutamate and aspartate concentrations increase significantly.<sup>7-9</sup> Moreover, glutamate receptor antagonists prevent ischemic damage in this brain area.<sup>10-12</sup>

Ischemia also causes a large increase in dopamine levels in the striatum,<sup>13</sup> and considerable evidence supports the idea that monoamines or their metabolic by-products may become neurotoxic during metabolic impairment, either directly or from interplay with the glutamatergic system.<sup>14,15</sup> In an in vitro model of striatal ischemia, for example, reduction of dopamine release has been found to be associated with a better histological outcome,<sup>13</sup> and unilateral 6-hydroxydopa-

mine (6-OHDA) lesion of the substantia nigra has been reported to reduce the volume of striatal necrosis induced by middle cerebral artery occlusion.<sup>16</sup> Thus, the dopaminergic nigrostriatal pathway could be highly involved in the vulnerability of the striatum to ischemia, and glutamate-dopamine interactions may play a key role in striatal ischemic insult.

We have recently shown that in vitro ischemia (oxygen and glucose deprivation) induces a long-term potentiation (i-LTP) of excitatory glutamatergic transmission at corticostriatal synapses.<sup>17</sup> This process depends on the stimulation of both *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) and metabotropic glutamate receptors and includes the activation of mitogen-activated protein kinase ERK via protein kinase C.

In the present study, to investigate the molecular and cellular events associated with dopamine release during energy deprivation, we performed intracellular recordings

Received February 14, 2002; final revision received June 3, 2002; accepted July 3, 2002.

From Clinica Neurologica, Dipartimento di Neuroscienze, Università "Tor Vergata," and IRCCS Fondazione Santa Lucia, Rome, Italy (E.S., D.C., G.B., P.C.); and Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain (A.B.M., R.M.).

Correspondence to Paolo Calabresi, MD, Clinica Neurologica, Dipartimento di Neuroscienze, Università "Tor Vergata," Via di Tor Vergata 135, 00133 Rome, Italy. E-mail: calabre@uniroma2.it

© 2002 American Heart Association, Inc.

*Stroke* is available at <http://www.strokeaha.org>

DOI: 10.1161/01.STR.0000038093.42512.0F

# Molecular phenotype of rat striatal neurons expressing the dopamine D<sub>5</sub> receptor subtype

Alicia Rivera,<sup>1,2,\*</sup> Israel Alberti,<sup>1,\*</sup> Ana B. Martín,<sup>1</sup> José A. Narváez,<sup>3</sup> Adelaida de la Calle<sup>2</sup> and Rosario Moratalla<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avda Dr Arce 37, 28002 Madrid, Spain

<sup>2</sup>Department of Cell Biology, <sup>3</sup>Department of Physiology, University of Málaga, 29071 Málaga, Spain.

**Keywords:** basal ganglia, cat, ChAT, D1/ D2 receptor synergism, striatal LTP

## Abstract

Dopamine is one of the principal neurotransmitters in the basal ganglia, where it plays a critical role in motor control and cognitive function through its interactions with the specific dopamine receptors D<sub>1</sub> to D<sub>5</sub>. Although the activities mediated by most dopamine receptor subtypes have already been determined, the role of the D<sub>5</sub> receptor subtype in the basal ganglia has still not been established. Furthermore, it is often difficult to distinguish between dopamine D<sub>5</sub> and D<sub>1</sub> receptors as they are stimulated by the same ligands, and they have a similar molecular structure and pharmacology. In an effort to understand the differences between these two receptor subtypes, we have studied the distribution of neurons containing D<sub>5</sub> receptors in the striatum, and their molecular phenotype. As a result, we show that the D<sub>5</sub> receptor subtype is present in two different populations of striatal neurons, projection neurons and interneurons. Overall, the abundance of this receptor subtype in the striatum is low, particularly in striatal projection neurons of both the direct and indirect projection pathways. In contrast, the expression of D<sub>5</sub> receptors in striatal interneurons (cholinergic, somatostatin- or parvalbumin-positive neurons) is high, while low to moderate expression was observed in calretinin-positive neurons. Our results demonstrate the presence of D<sub>5</sub> receptors in all the striatal cell populations so far described, although at different intensities in each. The fact that a large number of striatal neurons express the D<sub>5</sub> receptor subtype suggests that this receptor fulfils an important function in the process of integrating information in the striatum.

## Introduction

In the basal ganglia the striatum plays a pivotal role in the regulation of motor control, as well as in processing cognitive and emotional inputs. The integration of information within this neural system requires the precise coordination of the activities of striatal projection neurons and interneurons. Dopaminergic inputs from the substantia nigra play a crucial role regulating the activity of all striatal neurons. Dopamine (DA) acts on specific G protein-coupled receptors that are grouped into two families based on their biochemical, pharmacological and physiological profiles: D1-class (D<sub>1</sub> and D<sub>5</sub> subtypes) and D2-class (D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> and D<sub>4</sub> subtypes) (Missale *et al.*, 1998).

Not all striatal neurons are equally responsive to dopaminergic stimulation. Behavioural sensitization and drug addiction induced by chronic exposure to cocaine involves the activation of D1-class receptors and the expression of immediate early genes in specific striatal neurons that express dynorphin or somatostatin but not in cholinergic or enkephalin-positive neurons (Moratalla *et al.*, 1992, 1996a; Uslaner *et al.*, 2001; Centonze *et al.*, 2002). Striatal cholinergic neurons respond differently, as activation of D1-class receptors induces acetyl choline (ACh) release (Consolo *et al.*, 1992; Acquas & Di Chiara, 1999). This is due both to depolarization of cholinergic interneurons and to increase in cholinergic synaptic potentials (Consolo *et al.*, 1992; Aosaki *et al.*, 1998; Calabresi *et al.*, 1998; Acquas & Di

Chiara, 1999; Pisani *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2001; Koos & Tepper, 2002). In addition, these neurons respond to dopamine-dependent-sensory-motor conditioning, a response that is dependent on the stimulation of D<sub>1</sub>-class receptors (Aosaki *et al.*, 1994a,b). Although it is clear that these effects involve the participation of D<sub>1</sub>-class receptors, it has not been possible to differentiate between D<sub>1</sub>- and D<sub>5</sub>-dependent effects, as there are no specific pharmacological agents currently available to discriminate between them.

While the D<sub>1</sub> receptor subtype is much more abundant than the D<sub>5</sub> subtype, the presence of D<sub>5</sub> receptors in the striatum is not negligible because their affinity for dopamine is five times higher than that of D<sub>1</sub> receptors (Grandy *et al.*, 1991). The phenotype of neurons that express D<sub>1</sub> receptors is known. These receptors are mainly localized in neurons of the direct pathway and are coexpressed with the neuropeptides substance P and dynorphin (Gerfen *et al.*, 1990; Le Moine *et al.*, 1991; Moratalla *et al.*, 1996b; Fauchey *et al.*, 2000). However, it has also been suggested that D<sub>1</sub> receptors are significantly expressed in neurons of the indirect pathway (Surmeier *et al.*, 1996; Aizman *et al.*, 2000). Furthermore, D<sub>1</sub> receptors are weakly expressed on a small number of NOS-positive interneurons in the striatum (Le Moine *et al.*, 1991). Although it is known that D<sub>5</sub> receptors are expressed in large and medium size striatal neurons (Luedtke *et al.*, 1999; Ciliax *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 2000), the molecular phenotype of these neurons remains unclear. To better understand dopaminergic function in the basal ganglia it is critical to characterize the striatal neurons that express D<sub>5</sub> receptors. In this study, we have identified the molecular phenotype of projection neurons and interneurons that express the D<sub>5</sub> receptor subtype in the rat striatum, and we have compared their distribution in the rat and cat striatum.

Correspondence: Dr Rosario Moratalla, as above.  
E-mail: Moratalla@cajal.csic.es

\*A.R. and I.A. contributed equally to this work

Received 4 August 2002, revised 10 September 2002, accepted 13 September 2002

# Inactivation of Adenosine A<sub>2A</sub> Receptors Selectively Attenuates Amphetamine-Induced Behavioral Sensitization

Jiang-Fan Chen<sup>1,3</sup>, Rosario Moratalla<sup>2</sup>, Liqun Yu<sup>1,3</sup>, Ana B. Martín<sup>2</sup>, Kui Xu<sup>1</sup>, Elena Bastia<sup>1</sup>, Elizabeth Hackett<sup>1</sup>, Israel Alverti<sup>2</sup> and Michael A Schwarzschild<sup>\*,1</sup>

<sup>1</sup>Molecular Neurobiology Laboratory, Department of Neurology, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, MA, USA;

<sup>2</sup>Cajal Institute, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain

Repeated treatment with the psychostimulant amphetamine produces behavioral sensitization that may represent the neural adaptations underlying some features of psychosis and addiction in humans. In the present study we investigated the role of adenosine A<sub>2A</sub> receptors in psychostimulant-induced locomotor sensitization using an A<sub>2A</sub> receptor knockout (A<sub>2A</sub> KO) model. Daily treatment with amphetamine for 1 week resulted in an enhanced motor response on day 8 (by two-fold compared to that on day 1), and remained enhanced at day 24 upon rechallenge with amphetamine. By contrast, locomotor sensitization to daily amphetamine did not develop in A<sub>2A</sub> KO mice on day 8 or 24, and this absence was not the result of a nonspecific threshold effect. The absence of behavioral sensitization was selective for amphetamine since daily treatment with the D<sub>1</sub> agonist SKF81297 (2.5 mg/kg) or the D<sub>2</sub> agonist quinpirole (1.0 mg/kg) produced similar behavioral sensitization in both WT and A<sub>2A</sub> KO mice. Furthermore, coinjection of SKF81297 and quinpirole also resulted in indistinguishable locomotor sensitization in A<sub>2A</sub> KO and WT mice, suggesting normal D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptor responsiveness. Finally, at the cellular level A<sub>2A</sub> receptor inactivation abolished the increase in striatal dynorphin mRNA induced by repeated amphetamine administration. The selective absence of amphetamine-induced behavioral sensitization in A<sub>2A</sub> KO mice suggests a critical role of the A<sub>2A</sub> receptor in the development of psychostimulant-induced behavioral sensitization, and supports the pharmacological potential of A<sub>2A</sub> adenosinergic agents to modulate adaptive responses to repeated psychostimulant exposure. *Neuropsychopharmacology* (2003) **28**, 1086–1095, advance online publication, 9 April 2003; doi:10.1038/sj.npp.1300152

**Keywords:** adenosine A<sub>2A</sub> receptor; dopamine receptor; amphetamine; psychostimulant; behavioral sensitization; drug addiction

## INTRODUCTION

Repeated administration of psychostimulants (such as amphetamine or cocaine) induces an enhanced behavioral response to subsequent drug exposure, a phenomenon known as behavioral sensitization and capable of persisting for months (Robinson and Berridge, 1993; Pierce and Kalivas, 1997). The development of these maintained behavioral adaptations parallels the progressive and sustained enhancement of drug-craving and psychotic behaviors displayed by addicts only after repeated administration (Robinson and Berridge, 1993). Psychostimulant-induced behavioral sensitization in rodents provides a model of the addictive behaviors (such as those

associated with craving and relapse) and psychotic complications of psychostimulant abuse (Robinson and Becker, 1986; Robinson and Berridge, 1993). Thus, understanding the neural adaptations associated with psychostimulant-induced behavioral sensitization may be relevant to the pathophysiology of psychostimulant-associated disorders such as drug addiction and psychosis.

The critical role of dopaminergic transmission in psychostimulant-induced behavioral sensitization has been inferred from evidence that psychostimulants enhance the level of dopamine in the synapse either by increasing presynaptic dopamine release (amphetamine) or blocking dopamine reuptake (cocaine) (Koob, 1992; Self and Nestler, 1995; Tan *et al.*, 2000). Activation of both dopamine D<sub>1</sub>-like and D<sub>2</sub>-like receptors is involved in the behavioral response to amphetamine as antagonists at these receptors attenuate amphetamine-dependent behaviors (Hyman, 1996; Bardo, 1998; Wolf, 1998; Hyman and Malenka, 2001). Glutamatergic transmission has also been implicated in behavioral sensitization either through modulation of dopaminergic transmission or through an independent action (Wolf, 1998; Sripada *et al.*, 2001). In spite of intensive studies of psychostimulant action, effective pharmacological strategies for treating chronic psychostimulant-associated disorders

\*Correspondence: Dr MA Schwarzschild, Molecular Neurobiology Laboratory, MGH Center for Aging, Genetics and Neurodegeneration, 114 Street, Charlestown, MA 02129, USA, Tel: +1 617 724 9611, Fax: +1 617 724 1480, E-mail: michael.s@helix.mgh.harvard.edu

<sup>3</sup>Current address: Department of Neurology, Boston University School of Medicine, Boston, MA, USA.

Received 22 July 2002; revised 02 January 2003; accepted 06 January 2003

Online publication: 10 January 2003 at <http://www.acnp.org/citations/Npp011003456>

# NEUROANATOMICAL RELATIONSHIP BETWEEN TYPE 1 CANNABINOID RECEPTORS AND DOPAMINERGIC SYSTEMS IN THE RAT BASAL GANGLIA

M. D. JULIAN,<sup>a\*</sup> A. B. MARTIN,<sup>a</sup> B. CUELLAR,<sup>a</sup> F. RODRIGUEZ DE FONSECA,<sup>b</sup> M. NAVARRO,<sup>c</sup> R. MORATALLA<sup>a1</sup> AND L. M. GARCIA-SEGURA<sup>a1</sup>

<sup>a</sup>Instituto Cajal C.S.I.C., Dr. Arce 37, 28002 Madrid, Spain

<sup>b</sup>Unidad de Investigacion, Fundacion Hospital Carlos Haya, Malaga, Spain

<sup>c</sup>Departamento de Psicobiologia, Facultad de Psicologia, Universidad Complutense, Madrid, Spain

**Abstract**—Dopamine and endocannabinoids are neurotransmitters known to play a role in the activity of the basal ganglia motor circuit. While a number of studies have demonstrated functional interactions between type 1 cannabinoid (CB1) receptors and dopaminergic systems, we still lack detailed neuroanatomical evidence to explain their relationship. Single- and double-labeling methods (*in situ* hybridization and immunohistochemistry) were employed to determine both the expression and localization of CB1 receptors and tyrosine hydroxylase (TH) in the basal ganglia. In the striatum, we found an intense signal for CB1 receptor transcripts but low signal for CB1 receptor protein, whereas in the globus pallidus and substantia nigra we found the opposite; no hybridization signal but intense immunoreactivity. Consequently, CB1 receptors are synthesized in the striatum and mostly transported to its target areas. No co-expression or co-localization of CB1 receptors and TH was found. In the caudate-putamen, globus pallidus and substantia nigra, TH-immunoreactive fibers were interwoven with the CB1 receptor-immunoreactive neuropil and fibers. Our data suggest that the majority of the striatal CB1 receptors are located presynaptically on inhibitory GABAergic terminals, in a position to modulate neurotransmitter release and influence the activity of substantia nigra dopaminergic neurons. In turn, afferent dopaminergic fibers from the substantia nigra innervate CB1 receptor-expressing striatal neurons that are known to also express dopamine receptors. In conclusion, these data provide a neuroanatomical basis to explain functional interactions between endocannabinoid and dopaminergic systems in the basal ganglia. © 2003 IBRO. Published by

Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

**Key words:** endocannabinoids, dopamine, tyrosine hydroxylase, striatum, globus pallidus, substantia nigra.

The central cannabinoid system exerts its physiological actions mainly through type 1 cannabinoid (CB1) receptors. Endogenous (anandamide and 2-arachidonoyl glycerol) or exogenous cannabinoid ligands activate CB1 receptors to influence a broad range of functions, including learning, memory, cognition, pain perception, appetite, mood, endocrine regulation and motor activity (for review see Breivogel and Childers, 1998). CB1 receptors are expressed throughout the brain, located on structures involved in the physiological regulation of these functions (Herkenham et al., 1991a,b; Mailleux and Vanderhaeghen, 1992; Pettit et al., 1998). A particular enrichment of CB1 receptors has been found in the basal ganglia, a forebrain system that integrates cortical information to coordinate signals that regulate motor activity. The motor function of the basal ganglia comprises both the coding of motor sequences and the organization of natural behaviors (Aldridge and Berridge, 1998). It is well known that CB1 receptors in the basal ganglia participate in the regulation of coordinated motor behaviors (Rodriguez de Fonseca et al., 1998). Cannabinoid receptor agonists characteristically induce hyperactivity at low doses and depression of motor activity and catalepsy at high doses (Chaperon and Thiebot, 1999). In addition, the basal ganglia are involved in neurodegenerative disorders such as Parkinson's and Huntington's diseases (Graybiel, 1996; Gerfen, 2000) and changes in basal ganglia CB1 receptor expression or endocannabinoid levels have been described in rat models of Parkinson's disease (Di Marzo et al., 2000; Silverdale et al., 2001).

Molecular cloning of rat CB1 receptor (Matsuda et al., 1990) stimulated the study of the neurobiology of the endogenous cannabinoid system. Using CB1 receptor cDNA probes, together with agonists, antagonists and antibodies against the CB1 receptor, abundant neuroanatomical and functional findings have been reported. These studies employed diverse approaches such as ligand binding autoradiography (Herkenham et al., 1991a,b; Mailleux and Vanderhaeghen, 1992), *in situ* hybridization (Mailleux and Vanderhaeghen, 1993; Matsuda et al., 1993; Westlake et al., 1994), immunohistochemistry (Tsou et al., 1998; Pettit et al., 1998), electrophysiology (Gerdeman and Lovinger, 2001; Gerdeman et al., 2002) and behavior (Romero et al., 1995; Souilhac et al., 1995; Chaperon and Thiebot, 1999). However, CB1 receptor mechanisms of action appear to

<sup>1</sup> R. Moratalla and L. M. Garcia-Segura contributed equally to this study.

\*Corresponding author. Tel: +34-91-585-4729; fax: +34-91-585-4754.

E-mail address: djulian@cajal.csic.es (M. D. Julian).

**Abbreviations:** b.w., body weight; CART, cocaine and amphetamine regulated transcript; CB1 receptors, type 1 cannabinoid receptors; CPu, caudate putamen; D1, dopamine receptor type 1; D2, dopamine receptor type 2; DAB, 3,3'-diaminobenzidine; DAB-Ni, DAB intensified with nickel sulfate; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; ERK, extracellular signal-regulated kinase; GP, globus pallidus; PB, phosphate buffer; PBS, phosphate buffered saline; PBST, phosphate buffer containing Triton X-100 and bovine serum albumin; SN, substantia nigra; SNc, pars compacta of substantia nigra; SNr, pars reticulata of substantia nigra; SSC, saline sodium citrate; TH, tyrosine hydroxylase; THC,  $\Delta$ -9-tetrahydrocannabinol.

# Receptor Subtypes Involved in the Presynaptic and Postsynaptic Actions of Dopamine on Striatal Interneurons

Diego Centonze,<sup>1</sup> Cristina Grande,<sup>2</sup> Alessandro Usiello,<sup>3</sup> Paolo Gubellini,<sup>1</sup> Eric Erbs,<sup>3</sup> Ana B. Martín,<sup>2</sup> Antonio Pisani,<sup>1</sup> Nadia Tognazzi,<sup>3</sup> Giorgio Bernardi,<sup>1</sup> Rosario Moratalla,<sup>2\*</sup> Emiliana Borrelli,<sup>3\*</sup> and Paolo Calabresi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Clinica Neurologica, Dipartimento di Neuroscienze, Università "Tor Vergata," 00133 Rome, Italy, and Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico Fondazione Santa Lucia, 00179 Rome, Italy, <sup>2</sup>Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 28002 Madrid, Spain, and <sup>3</sup>Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique–Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale–Université Louis Pasteur, BP 10142, CU de Strasbourg, France

By stimulating distinct receptor subtypes, dopamine (DA) exerts presynaptic and postsynaptic actions on both large aspiny (LA) cholinergic and fast-spiking (FS) parvalbumin-positive interneurons of the striatum. Lack of receptor- and isoform-specific pharmacological agents, however, has hampered the progress toward a detailed identification of the specific DA receptors involved in these actions.

To overcome this issue, in the present study we used four different mutant mice in which the expression of specific DA receptors was ablated. In D1 receptor null mice, D1R<sup>−/−</sup>, DA dose-dependently depolarized both LA and FS interneurons. Interestingly, SCH 23339 (10  $\mu$ M), a D1-like (D1 and D5) receptor antagonist, but not L-sulpiride (3–10  $\mu$ M), a D2-like (D2, D3, D4) receptor blocker, prevented this effect, implying D5 receptors in this action. Accordingly, immunohistochemical analyses in both wild-type and D1R<sup>−/−</sup> mice confirmed the expression of D5 receptors in both cholinergic and parvalbumin-positive interneurons of the striatum.

In mice lacking D2 receptors, D2R<sup>−/−</sup>, the DA-dependent inhibition of GABA transmission was lost in both interneuron populations. Both isoforms of D2 receptor, D2L and D2S, were very likely involved in this inhibitory action, as revealed by the electrophysiological analysis of the effect of the DA D2-like receptor agonist quinpirole in two distinct mutants lacking D2L receptors and expressing variable contents of D2S receptors.

The identification of the receptor subtypes involved in the actions of DA on different populations of striatal cells is essential to understand the circuitry of the basal ganglia and to develop pharmacological strategies able to interfere selectively with specific neuronal functions.

**Key words:** basal ganglia; D1 receptors; D2L receptors; D2S receptors; electrophysiology; GABA transmission; mutant mice

## Introduction

Nigrostriatal dopamine (DA) innervation plays an essential role in the control of striatal neuron activity by interacting with multiple membrane conductances (Calabresi et al., 1987; Schiffmann et al., 1995; Surmeier et al., 1995; Lin et al., 1996; Hernandez-Lopez et al., 2000) and with excitatory and inhibitory transmission (Cepeda et al., 1993, 1998, 2001; Hsu et al., 1995; Delgado et al., 2000; Flores-Hernandez et al., 2000; Centonze et al., 2002). In

addition, DA exerts a complex modulatory control on the activity of striatal projection neurons through long-term mechanisms (Calabresi et al., 1997, 2000b; Arbuthnott et al., 2000; Centonze et al., 2001; Kerr and Wickens, 2001; Tang et al., 2001). In recent years, the modulation of interneuron activity has emerged as a critical function of DA in the striatum (Yan and Surmeier, 1997; Yan et al., 1997; Aosaki et al., 1998; Pisani et al., 2000; Momiyama and Koga, 2001; Bracci et al., 2002). The DA-mediated regulation of striatal interneuron activity, in turn, may provide strong control of the whole basal ganglia circuitry.

On the basis of the main transmitter released, striatal interneurons are differentiated into two distinct groups: cholinergic cells and GABAergic cells. They comprise only 2–4% of the neuronal population of the striatum, the remaining being represented by medium spiny projection cells (Kawaguchi, 1992, 1993; Kawaguchi et al., 1995). Striatal cholinergic interneurons are large (20–50  $\mu$ m) aspiny neurons and represent the main source of acetylcholine (ACh) in the striatum. These neurons modulate spiny neuron activity through presynaptic and postsynaptic actions (Galarraga et al., 1999; Calabresi et al., 2000a; Koos and Tepper, 2002). On the other hand, GABAergic interneurons are aspiny cells of medium size (10–25  $\mu$ m) that are immunoreactive

Received Dec. 16, 2002; revised April 24, 2003; accepted April 24, 2003.

This work was supported by grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre National de la Recherche Scientifique, Hopitaux Universitaires de Strasbourg, and Mission Interministérielle de Lutte contre la Drogue et la Toxicomanie (E.B.); from Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología SAF200-0122, Plan National Sobre Drogas and Fundación La Caixa, Spain (R.M.); and from Consiglio Nazionale delle Ricerche and Ministero della Salute, Progetto Finalizzato Schizofrenia (P.C.).

\*R.M., E.B., and P.C. contributed equally to this work.

Correspondence should be addressed to one of the following: Paolo Calabresi, Clinica Neurologica, Dipartimento di Neuroscienze, Università di Roma "Tor Vergata," Via Montpellier 1, 00133 Rome, Italy. E-mail: paolo.calabresi@uniroma2.it; or Rosario Moratalla, Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avenida Dr. Arce 37, 28002, Madrid, Spain. E-mail: moratalla@icajal.csic.es; or Emiliana Borrelli, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique–Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale–ULP1, Rue L. Fries, BP10142, 67404 Illkirch Cedex, C.U. de Strasbourg, France. E-mail: eb@titus.u-strasbg.fr.

Copyright © 2003 Society for Neuroscience 0270-6474/03/236245-10\$15.00/0



# Distinct Roles of D<sub>1</sub> and D<sub>5</sub> Dopamine Receptors in Motor Activity and Striatal Synaptic Plasticity

Diego Centonze,<sup>1,2</sup> Cristina Grande,<sup>3</sup> Emilia Saulle,<sup>1,2</sup> Ana B. Martín,<sup>3</sup> Paolo Gubellini,<sup>1,2,4</sup> Nancy Pavón,<sup>3</sup> Antonio Pisani,<sup>1,2</sup> Giorgio Bernardi,<sup>1,2</sup> Rosario Moratalla,<sup>3\*</sup> and Paolo Calabresi<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Clinica Neurologica, Dipartimento di Neuroscienze, Università di Tor Vergata, 00133 Rome, Italy, <sup>2</sup>Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico, Fondazione Santa Lucia, 00179 Rome, Italy, <sup>3</sup>Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 28002 Madrid, Spain, and <sup>4</sup>Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Fonctionnelle, Centre National de la Recherche Scientifique, 13402 Marseille Cedex 20, France

Stimulation of dopamine (DA) receptors in the striatum is essential for voluntary motor activity and for the generation of plasticity at corticostriatal synapses. In the present study, mice lacking DA D<sub>1</sub> receptors have been used to investigate the involvement of the D<sub>1</sub>-like class (D<sub>1</sub> and D<sub>5</sub>) of DA receptors in locomotion and corticostriatal long-term depression (LTD) and long-term potentiation (LTP). Our results suggest that D<sub>1</sub> and D<sub>5</sub> receptors exert distinct actions on both activity-dependent synaptic plasticity and spontaneous motor activity. Accordingly, the ablation of D<sub>1</sub> receptors disrupted corticostriatal LTP, whereas pharmacological blockade of D<sub>5</sub> receptors prevented LTD. On the other side, genetic ablation of D<sub>1</sub> receptors increased locomotor activity, whereas the D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub> receptor antagonist SCH 23390 decreased motor activity in both control mice and mice lacking D<sub>1</sub> receptors.

Endogenous DA stimulated D<sub>1</sub> and D<sub>5</sub> receptors in distinct subtypes of striatal neurons to induce, respectively, LTP and LTD. In control mice, in fact, LTP was blocked by inhibiting the D<sub>1</sub>–protein kinase A pathway in the recorded spiny neuron, whereas the striatal nitric oxide-producing interneuron was presumably the neuronal subtype stimulated by D<sub>5</sub> receptors during the induction phase of LTD.

Understanding the role of DA receptors in striatal function is essential to gain insights into the neural bases of critical brain functions and of dramatic pathological conditions such as Parkinson's disease, schizophrenia, and drug addiction.

**Key words:** basal ganglia; behavior; *in vitro* electrophysiology; interneurons; long-term depression; long-term potentiation; nitric oxide

## Introduction

Dopamine (DA) signaling in the striatum plays a central role in a variety of motor and cognitive activities. Abnormal striatal DAergic transmission is involved in several neuropsychiatric diseases, such as parkinsonism, schizophrenia, and drug addiction (Berke and Hyman, 2000; Lewis and Lieberman, 2000; Oleso et al., 2000). Endogenous DA, released from midbrain DA neurons, modulates striatal function by interacting with DA receptors. Among the various subtypes of DA receptors, the D<sub>1</sub>-like family has been involved in the regulation of motor activity and in the expression of activity-dependent synaptic plasticity at corticostriatal synapses. Accordingly, pharmacological inhibition of D<sub>1</sub>-like receptors reduces spontaneous motor activity (Meyer et al., 1993; Vallone et al., 2000) and prevents both long-term depression (LTD) and long-term potentiation (LTP) (Calabresi et al., 1992a, 2000; Centonze et al., 2001; Kerr and Wickens, 2001). To date, however, it is still unknown which member of the D<sub>1</sub>-like

family of DA receptors (D<sub>1</sub> or D<sub>5</sub>) mediates these actions of DA in the striatum. In this respect, both D<sub>1</sub> and D<sub>5</sub> receptors are expressed in the striatum (Bergson et al., 1995; Surmeier et al., 1996; Yan and Surmeier, 1997; Rivera et al., 2002a), are positive regulators of adenylyl cyclase activity (Stoof and Kebabian, 1981; Grandy et al., 1991; Sunahara et al., 1991; Tiberi et al., 1991; Vallone et al., 2000), and might be, in principle, equally important for both motor activity and ordered synaptic plasticity. However, the evidence that the quantitative ratios of these receptors differ significantly in the various neuronal populations of the striatum (Bergson et al., 1995; Surmeier et al., 1996; Yan and Surmeier, 1997; Rivera et al., 2002a) supports the concept that they serve distinct physiological roles.

In the present study, therefore, we used mice in which the expression of DA D<sub>1</sub> receptors was selectively disrupted to analyze the involvement of D<sub>1</sub> and D<sub>5</sub> receptors in locomotor activity and corticostriatal LTD and LTP.

## Materials and Methods

Male wild-type (WT) and D<sub>1</sub> DA receptor knock-out (D<sub>1</sub>–/–) mice (Xu et al., 1994) (2–3 months of age) were used for all the experiments.

**Locomotor activity.** For locomotor activity studies, we used a multicage activity meter system (Digiscam Animal Activity Monitor; Columbus Instruments, Columbus, OH). This apparatus consisted of eight individual mice cages (21 × 21 × 30 cm), equipped with two sets (one above the other) of eight photocell beams per side spaced 2.5 cm to measure horizontal and vertical activity. WT and D<sub>1</sub>–/– mice were habituated to the

Received March 20, 2003; revised June 24, 2003; accepted July 17, 2003.

This work has been supported by Ministerio de Ciencia y Tecnología Grant SAF200-0122, Plan National Sobre Drogas, and Fundación La Caixa (Spain) (R.M.) and Consiglio Nazionale delle Ricerche and Ministero della Salute, Progetto Finalizzato Schizofrenia (Italy) (P.C.). We thank Sonia Villa for her help with the behavioral experiments.

\*R.M. and P.C. contributed equally to this work.

Correspondence should be addressed to either of the following: Paolo Calabresi, Clinica Neurologica, Dipartimento di Neuroscienze, Università di Tor Vergata, Via Montpellier 1, 00133 Rome, Italy, E-mail: calabresi@uniroma2.it; or Rosario Moratalla, Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avda Dr. Arce 37, 28002 Madrid, Spain, E-mail: moratalla@cajal.csic.es

Copyright © 2003 Society for Neuroscience 0270-6474/03/238506-07\$15.00/0

# Absence of hematopoiesis from transplanted olfactory bulb neural stem cells

María J. Yusta-Boyo,<sup>1\*</sup> Manuel A. González,<sup>2\*</sup> Nancy Pavón,<sup>3</sup> Ana B. Martín,<sup>3</sup> Ricardo de la Fuente,<sup>4</sup> Javier García-Castro,<sup>4</sup> Flora de Pablo,<sup>1</sup> Rosario Moratalla,<sup>3</sup> Antonio Bernad<sup>4</sup> and Carlos Vicario-Abejón<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Group of Growth Factors in Vertebrate Development, Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Ramiro de Maeztu 9, E-28040 Madrid, Spain

<sup>2</sup>Genetrix S.L., Madrid, Spain

<sup>3</sup>Instituto Cajal, CSIC, Madrid, Spain

<sup>4</sup>Department of Immunology and Oncology (DIO), Centro Nacional de Biotecnología (CNB), Madrid, Spain

**Keywords:** blood cells, cell differentiation, glia, mouse, neurons

## Abstract

Neural stem cells giving rise to neurons and glia cells have been isolated from the embryonic and adult central nervous system. The extent to which they are able to differentiate into cells of non-neural lineages, such as the hematopoietic lineage, is nonetheless unclear. We previously reported the isolation of stem cells from the mouse olfactory bulb neuroepithelium. In the present study, we analysed whether olfactory bulb stem cells (OBSC) can generate cells with hematopoietic features. Cells were prepared from the olfactory bulbs of transgenic mice expressing enhanced green fluorescent protein (EGFP). In culture, transgenic cells proliferated with the same kinetics as wild-type cells. Following mitogen removal, both cell types gave rise to similar numbers of neurons, astrocytes and oligodendrocytes, indicating that EGFP overexpression does not alter OBSC proliferation and differentiation patterns. When these cells were injected into the tail vein of irradiated mice, no hematopoietic cells derived from the OBSC could be recovered in their peripheral blood, spleen or bone marrow. By contrast, when OBSC were transplanted into the adult brain, EGFP-positive cells were found in the striatum and corpus callosum; differentiated cells expressed antigenic markers of neurons and astrocytes. These results suggest that embryonic olfactory bulb stem cells are not endowed with the potential to produce hematopoiesis.

## Introduction

Pluripotent embryonic stem (ES) cells located in the inner cell mass of mammals give rise to all body tissues and organs with the exception of the placenta (Smith, 2001). The action of extracellular factors as well as intrinsic genetic information impose temporal and spatial restrictions on ES differentiation potential, and therefore the diverse body cell types are formed progressively. Cells having stem cell features, i.e. self-renewal and the ability to differentiate into a limited number of cell types, can be isolated from many developing tissues (Fuchs & Segre, 2000). Among these, multipotent neural stem cells (NSC) have the potential to generate the principal cells of the nervous system, i.e. neurons, astrocytes and oligodendrocytes (McKay, 1997; Temple, 2001; Vicario-Abejón *et al.*, 2003).

A number of recent studies have reported that in addition to the ability of NSC to differentiate into neuronal and glial cell types, they can also give rise to non-neural cells such as myocytes, cardiomyocytes, hematopoietic or kidney cells (Bjornson *et al.*, 1999; Clarke *et al.*, 2000; Galli *et al.*, 2000; Tsai & McKay, 2000; Shih *et al.*, 2001; Tropepe *et al.*, 2001). Bjornson *et al.* (1999) reported that NSC isolated from the embryonic striatum and the adult forebrain periventricular zone adopted hematopoietic cell fates after transplantation into irradiated mice.

Shih *et al.* (2001) similarly showed hematopoietic reconstitution of SCID-hu mice with transplanted human embryonic NSC. Generation of neural cells from non-neural stem cells has also been described. Hematopoietic, mesenchymal or skin-derived stem cells were reported to generate neurons and glia in the brain (Brazelton *et al.*, 2000; Mezey *et al.*, 2000; Priller *et al.*, 2001; Toma *et al.*, 2001; Bonilla *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2002; Mezey *et al.*, 2003; Weimann *et al.*, 2003). Other studies, nonetheless, suggest that the ability observed for NSC to give rise to blood cells may be a rare phenomenon, possibly the result of genetic mutations occurring after multiple passages of the donor cells, or due to contamination, given the lack of a strict pretransplant clonogenic assay (Morshead *et al.*, 2002; Magrassi *et al.*, 2003). In addition, results describing transdifferentiation of cells from one lineage to a different one may also be due to cell fusion events (Castro *et al.*, 2002; Frisén, 2002; Wagers *et al.*, 2002; Vassilopoulos *et al.*, 2003).

The above conflicting data imply the need for further studies to obtain a comprehensive view of the potential of NSC to produce cells of the hematopoietic lineage. This potential may depend, at least in part, on the brain region origin of NSC (Hitoshi *et al.*, 2002; Parmar *et al.*, 2002). We isolated and characterized stem cells from the olfactory bulb neuroepithelium (OBSC; Vicario-Abejón *et al.*, 2003). In culture, these cells differentiate efficiently into neurons and glia, but whether they have the capacity to produce non-neural cells was not tested. Here we analysed whether OBSC had the potential to generate hematopoietic cells. Stem cells were prepared from the

Correspondence: Dr C. Vicario-Abejón, as above.  
E-mail: cvicario@cib.csic.es

\*M.J.Y.-B. and M.A.G. contributed equally to this work.



# Chronic Treatment with Atypical Neuroleptics Induces Striosomal FosB/ $\Delta$ FosB Expression in Rats

Cristina Grande, Hongwen Zhu, Ana B. Martin, MoonSook Lee, Oscar Ortiz, Noboru Hiroi, and Rosario Moratalla

**Background:** Studies have shown that neuroleptics regulate expression of the transcription factor FosB/ $\Delta$ FosB in the striatum, including the accumbens and caudate-putamen; however, the striatum is also divided into another structural dimension, the striosome and matrix compartments. The precise distribution of FosB/ $\Delta$ FosB induced by chronic neuroleptics in these striatal compartments is poorly understood.

**Methods:** Rats received either single acute injections or chronic injections of clozapine (0 or 20 mg/kg, intraperitoneally [IP]), olanzapine (0 or 5 mg/kg, IP), or haloperidol (0 or 1.5 mg/kg, IP) for 25 days. The levels and compartmental distribution of FosB/ $\Delta$ FosB were examined.

**Results:** Chronic clozapine induced clustered FosB/ $\Delta$ FosB expression within striosomes of the caudate-putamen. This pattern was due to increased levels of FosB/ $\Delta$ FosB in striosomes within the ventrolateral caudate-putamen and reduced levels of basal FosB/ $\Delta$ FosB in the matrix in the entire caudate-putamen. In contrast, chronic haloperidol increased FosB/ $\Delta$ FosB equally within the matrix and striosomes throughout the entire caudate-putamen. Chronic olanzapine induced an intermediate pattern.

**Conclusions:** The relative absence of FosB/ $\Delta$ FosB expression in the matrix correlates with the lack of parkinsonism of atypical neuroleptics. Expression of FosB/ $\Delta$ FosB in the matrix may contribute to parkinsonism of typical neuroleptics.

**Key Words:** Striosome, matrix, FosB, neuroleptics, schizophrenia, extrapyramidal motor side effects

A number of neuroleptic drugs have been introduced into clinical settings as effective treatment options for schizophrenia. These drugs are generally classified as either typical or atypical. Typical neuroleptics attenuate the positive symptoms of schizophrenia, such as delusions and hallucinations, but they are relatively ineffective for alleviating the negative symptoms (i.e., anergia, anhedonia, avolition, affective flattening, and lack of interpersonal and social drive and interaction). Typical neuroleptics also induce untoward extrapyramidal motor side effects. In contrast, clozapine, an atypical neuroleptic, not only improves both the positive and negative symptoms of schizophrenia, but it also lacks the undesirable motor side effects associated with typical neuroleptics (Kinon and Lieberman 1996; Meltzer 1999a, 1999b; Reynolds 1997; Tandon 2002; Volavka et al 2002). Various mechanisms have been suggested to explain the basis for the differential actions of typical versus atypical neuroleptics. It is thought that typical neuroleptics induce extrapyramidal motor side effects by acting as dopamine receptor antagonists within the caudate-putamen (Kinon and Liberman 1996; Tandon 2002). The unique properties of clozapine have been attributed to its selective effects on serotonin and dopamine receptors in limbic and cortical structures (Meltzer 1999a, 1999b; Mrzljak et al 1996; Seeman and van Tol 1994; Tandon 2002).

Recent studies have demonstrated that the potencies of neuroleptics for inducing extrapyramidal motor side effects correlate with their unique patterns of regulation of gene expres-

sion in the caudate-putamen. Typical, but not atypical, neuroleptics robustly induce the transcription factor FosB and its truncated variant  $\Delta$ FosB in the caudate-putamen. Unlike c-Fos, another member of this protein family,  $\Delta$ FosB is upregulated in response to chronic neuroleptic treatment (Atkins et al 1999; Hiroi and Graybiel 1996; Rodriguez et al 2001; Vahid-Ansari et al 1996). A role for striatal FosB/ $\Delta$ FosB induction in motor impairment is further suggested by the findings that this protein is significantly elevated when dopamine is depleted from the striatum of rats and monkeys (Bronstein et al 1994; Cenci et al 1999; Doucet et al 1996; Hope et al 1994; Perez-Otano et al 1998; Vallone et al 1997). Moreover, elevated FosB/ $\Delta$ FosB levels have also been reported in the striatum of patients with Parkinson's disease (Tekumulla et al 2001). Studies of *fosB* knockout and transgenic mice have shown that FosB/ $\Delta$ FosB plays a functional role in other motor behaviors (Hiroi et al 1997, 1998; Kelz et al 1999). Thus, regulation of this gene by neuroleptics might have functional relevance to the motor side effects of these drugs.

The caudate-putamen is a heterogeneous structure that contains neurochemically identifiable islands, termed patches or striosomes (Gerfen 1992; Graybiel 1990). Striosomes (or patches) are tightly linked to limbic regions that are believed to be targets of the antipsychotic actions of neuroleptics. Moreover, striosomes are functionally associated with reward-related behavior (White and Hiroi 1998) and stimulant-induced neuronal events (Moratalla et al 1996b). In contrast, the matrix surrounding the striosomes is coupled to sensorimotor regions of the brain and is more closely associated with functions that have been generally ascribed to the caudate-putamen (Berretta et al 1997; Brown et al 2002). The precise pattern by which chronic neuroleptic treatment induces FosB/ $\Delta$ FosB in the striosome-matrix compartments is poorly understood. It is important to determine the distribution of FosB/ $\Delta$ FosB induced by chronic, as opposed to acute, treatment because long-term treatment is required for the antipsychotic effects of neuroleptics on the symptoms of schizophrenia (Kane et al 1988; Harvey et al 1991; Stern et al 1993; Tandon et al 1999). We hypothesized that the striosome and matrix compartments of the caudate-putamen mediate the antipsychotic and extrapyramidal motor side effects of neuroleptics, respectively. The goal of this study was to determine whether

From the Cajal Institute (CG, ABM, OO, RM), Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain; and Departments of Psychiatry and Behavioral Sciences (HZ, ML, NH), and Neuroscience (HZ, MSL, NH), Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York.

Address reprint requests to Rosario Moratalla, Ph.D., Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avda Dr. Arce, 37, Madrid 28002, Spain.

Received May 30, 2003; revised August 13, 2003; accepted August 15, 2003.

# ERK Phosphorylation and FosB Expression Are Associated with L-DOPA-Induced Dyskinesia in Hemiparkinsonian Mice

Nancy Pavón, Ana B. Martín, Ainhoa Mendiola, and Rosario Moratalla

**Background:** The dopamine precursor 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine (L-DOPA) is currently the most efficacious noninvasive therapy for Parkinson's disease. A major complication of this therapy, however, is the appearance of the abnormal involuntary movements known as dyskinesias. We have developed a model of L-DOPA-induced dyskinesias in mice that reproduces the main clinical features of dyskinesia in humans.

**Methods:** Dyskinetic symptoms were triggered by repetitive administration of a constant dose of L-DOPA (25 mg/kg, twice a day, for 25 days) in unilaterally 6-hydroxydopamine (6-OHDA) lesioned mice. Mice were examined for behavior, expression of FosB, neuropeptides, and externally regulated kinase (ERK) phosphorylation.

**Results:** Dyskinetic symptoms appear toward the end of the first week of treatment and are associated with L-DOPA-induced changes in  $\Delta$ FosB and prodynorphin expression. L-DOPA also induces activation of ERK1/2 in the dopamine-depleted striatum. Interestingly, elevated FosB/ $\Delta$ FosB expression occurs exclusively within completely lesioned regions of the striatum, displaying an inverse correlation with remaining dopaminergic terminals. Following acute L-DOPA treatment, FosB expression occurs in direct striatal output neurons, whereas chronic L-DOPA also induces FosB expression in nitric oxide synthase-positive striatal interneurons.

**Conclusions:** This model provides a system in which genetic manipulation of individual genes can be used to elucidate the molecular mechanisms responsible for the development and expression of dyskinesia.

**Key Words:** Dopamine, dynorphin, dyskinesia, ERK1/2 phosphorylation, FosB, Parkinson's disease, striatum

Treatment with the dopamine precursor 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine (L-DOPA) is currently the most effective noninvasive therapy for Parkinson's disease. The response to this treatment changes as the disease progresses, however, and chronic L-DOPA administration causes abnormal involuntary movements known as dyskinesias (Jenner 2004; Marsden 1994). Dyskinesias are manifested in a wide range of motor symptoms ranging from orofacial movements to abnormal movements of the extremities similar to ballism or chorea and dystonic postures (Jenner 2004; Obeso et al 2000, 2004). Generally, dyskinesia occurs when dopamine concentration in the brain is the highest and is therefore called peak-dose dyskinesia (Olanow et al 2004); it can also occur throughout the "on" time period (the period of response of L-DOPA treatment). The appearance of dyskinesia represents a challenge to Parkinsonian therapy because it can be severe enough to warrant reducing the L-DOPA dose below optimal therapeutic levels.

Despite the high incidence and clinical relevance of dyskinesia, little is known about the molecular mechanisms that underlie it. This is in part due to the lack of animal models that accurately reproduce the range of motor symptoms observed in patients. In the last few years, however, it has been shown that dyskinesia-like changes in motor responses consistently occur in parkinsonian rats undergoing chronic administration of L-DOPA or other dopaminomimetic compounds (Canales and Graybiel 2000; Cenci et al 1998; Lundblad et al 2002). These rats exhibit abnormal involuntary movements and motor fluctuations or

"wearing off" effects similar to those observed in parkinsonian patients (Cenci et al 1998; Perier et al 2003; Marín et al 2004).

Short- and long-term changes in gene expression following repeated intermittent administration of L-DOPA have been considered to be part of the neural plasticity underlying dyskinesias induced in rats and monkeys (Calon et al 2000; Cenci et al 1998). Repeated exposure to L-DOPA triggers a molecular cascade of signaling molecules including the activation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-dependent kinase, phosphorylation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors and other D1-related proteins (Picconi et al 2003) and induction of immediate-early and late response gene expression (Lee et al 2000). These molecular alterations serve as anatomic and molecular markers of striatal plasticity induced by chronic intermittent dopamine receptor stimulation and appear to be an integral part of the molecular cascade that causes behavioral sensitization and dyskinesias.

In addition, changes in mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling pathways have been shown to be associated with the supersensitive response to dopaminergic stimulation in dopamine-depleted striatum (Gerfen et al 2002). For instance, SKF38393, a partial dopamine D1 receptor agonist, dramatically increases externally regulated kinase (ERK)1/2 phosphorylation in the 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-lesioned striatum (Gerfen et al 2002). Moreover, ERK1/2 phosphorylation has also been implicated in many forms of synaptic plasticity in the brain, particularly in long-lasting forms of synaptic plasticity such as "late long-term potentiation (LTP)" and memory processes (Kelleher et al 2004; Thomas and Huganir 2004), and because dyskinesia may be an abnormal form of motor learning, it is possible that ERK1/2 phosphorylation is also implicated in dyskinesia.

Despite the well-documented association between these molecular markers and the occurrence of dyskinesia, it is still unclear which molecular changes mediate the development and expression of dyskinesia during chronic L-DOPA treatment. Transgenic and knockout mice already exist for many components of dopaminergic signaling pathways and it is now straight-

From the Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain.

Address reprint requests to Rosario Moratalla Instituto Cajal, CSIC, Avenida Dr. Arce 37, 28002, Madrid, Spain; E-mail: moratalla@cajal.csic.es.

Received January 27, 2004; revised April 27, 2005; accepted May 31, 2005.

Ainhua Bilbao · Andrea Cippitelli · Ana B. Martín ·  
Noelia Granado · Oscar Ortiz · Erwan Bezard ·  
Jiang-Fan Chen · Miguel Navarro ·  
Fernando Rodríguez de Fonseca · Rosario Moratalla

## Absence of quasi-morphine withdrawal syndrome in adenosine $A_{2A}$ receptor knockout mice

Received: 22 June 2005 / Accepted: 21 November 2005 / Published online: 10 February 2006  
© Springer-Verlag 2006

**Abstract** *Rationale:* Caffeine and other methylxanthines induce behavioral activation and anxiety responses in mice via antagonist action at  $A_{2A}$  adenosine receptors. When combined with the opioid antagonist naloxone, methylxanthines produce a characteristic quasi-morphine withdrawal syndrome (QMWS) in opiate-naïve animals. *Objectives:* The aim of this study was to establish the role of  $A_{2A}$  receptors in the quasi-morphine withdrawal syndrome induced by co-administration of caffeine and naloxone and in the behavioral effects of caffeine. *Methods:* We have used  $A_{2A}$  receptor knockout ( $A_{2A}R^{-/-}$ ) mice in comparison with their wild-type and heterozygous littermates to measure locomotor activity in the open field and withdrawal symptoms induced by caffeine and naloxone. Naïve wild-type and knockout mice were also

examined for enkephalin and dynorphin mRNA expression by in situ hybridization and for  $\mu$ -opiate receptor by ligand binding autoradiography to check for possible opiate receptor changes induced by  $A_{2A}$  receptor inactivation. *Results:* Caffeine increases locomotion and anxiety in wild-type animals, but it has no psychomotor effects in  $A_{2A}R^{-/-}$  mice. Co-administration of caffeine (20 mg/kg) and naloxone (2 mg/kg) resulted in a severe quasi-morphine withdrawal syndrome in wild-type mice that was almost completely abolished in  $A_{2A}R^{-/-}$  mice. Heterozygous animals exhibited a 40% reduction in withdrawal symptoms, suggesting that there is no genetic/developmental compensation for the inactivation of one of the  $A_{2A}R$  alleles.  $A_{2A}R^{-/-}$  and wild-type mice have similar levels of striatal  $\mu$ -opioid receptors, thus the effect is not due to altered opioid receptor expression. *Conclusions:* Our results demonstrate that  $A_{2A}$  receptors are required for the induction of quasi-morphine withdrawal syndrome by co-administration of caffeine and naloxone and implicate striatal  $A_{2A}$  receptors and  $\mu$ -opiate receptors in tonic inhibition of motor activity in the striatum.

A. Bilbao · A. Cippitelli · M. Navarro · F. Rodríguez de Fonseca  
Departamento de Psicobiología,  
Instituto Universitario de Drogodependencias,  
Universidad Complutense,  
Madrid 28223, Spain

A. B. Martín · N. Granado · O. Ortiz · R. Moratalla (✉)  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas,  
Instituto Cajal,  
C/Doctor Arce, 37  
Madrid 28002, Spain  
e-mail: moratalla@cajal.csic.es  
Tel.: +34-915854705

A. Bilbao · A. Cippitelli · F. Rodríguez de Fonseca  
Fundación IMABIS,  
Hospital Regional Universitario Carlos Haya,  
Málaga 29010, Spain

E. Bezard  
Physiologie et Physiopathologie de la Signalization cellulaire,  
UMR-CNRS 5543, Université Victor Segalen Bordeaux2,  
33076 Bordeaux, France

J.-F. Chen  
Department of Neurology,  
Boston University School of Medicine,  
Boston, MA 02218, USA

**Keywords** Caffeine · Abstinence · Abuse · Naloxone · Basal ganglia · Anxiety · Locomotor activity · Behavior · Morphine

### Introduction

Adenosine, a neuromodulator in the brain (Haas and Selbach 2000; Dunwiddie and Masino 2001), exerts its physiological actions through activation of a family of seven transmembrane domain, G protein-coupled receptors, including the  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$ , and  $A_3$  receptors (Fredholm et al. 2001; Ribeiro et al. 2003). In contrast to the widespread distribution of  $A_1$ ,  $A_{2B}$ , and  $A_3$  receptors within the central nervous system,  $A_{2A}$  receptors ( $A_{2A}R$ ) are almost exclusively localized in the striatum and olfactory tubercle (Johansson et al. 1997; Moreau and Huber 1999; Rebola et al. 2005).

# Expression and Function of CB<sub>1</sub> Receptor in the Rat Striatum: Localization and Effects on D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> Dopamine Receptor-Mediated Motor Behaviors

Ana Belén Martín<sup>1</sup>, Emilio Fernandez-Espejo<sup>\*2</sup>, Belén Ferrer<sup>3,4</sup>, Miguel Angel Gorriti<sup>4</sup>, Ainhua Bilbao<sup>3</sup>, Miguel Navarro<sup>4</sup>, Fernando Rodriguez de Fonseca<sup>\*3,4</sup> and Rosario Moratalla<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, Spain; <sup>2</sup>Departamento de Fisiología Médica, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain; <sup>3</sup>Fundación IMABIS, Hospital Regional Universitario Carlos Haya, Málaga, Spain; <sup>4</sup>Instituto Universitario de Drogodependencias, Departamento de Psicobiología, Universidad Complutense, Madrid, Spain

Cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors are densely expressed on striatal projection neurons expressing dopamine D<sub>1</sub> or D<sub>2</sub> receptors. However, the specific neuronal distribution of CB<sub>1</sub> receptors within the striatum is not known. Previous research has established that the endocannabinoid system controls facilitation of behavior by dopamine D<sub>2</sub> receptors, but it is not clear if endocannabinoids also modulate D<sub>1</sub> receptor-mediated motor behavior. In the present study, we show that cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor mRNA is present in striatonigral neurons expressing substance P and dopamine D<sub>1</sub> receptors, as well as in striatopallidal neurons expressing enkephalin and dopamine D<sub>2</sub> receptors. We explored the functional relevance of the interaction between dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors and cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors with behavioral pharmacology experiments. Potentiation of endogenous cannabinoid signaling by the uptake blocker AM404 blocked dopamine D<sub>1</sub> receptor-mediated grooming and D<sub>2</sub> receptor-mediated oral stereotypies. In addition, contralateral turning induced by unilateral intrastratial infusion of D<sub>1</sub> receptor agonists is counteracted by AM404 and potentiated by the cannabinoid antagonist SR141716A. These results indicate that the endocannabinoid system negatively modulates D<sub>1</sub> receptor-mediated behaviors in addition to its previously described effect on dopamine D<sub>2</sub> receptor-mediated behaviors. The effect of AM404 on grooming behavior was absent in dopamine D<sub>1</sub> receptor knockout mice, demonstrating its dependence on D<sub>1</sub> receptors. This study indicates that the endocannabinoid system is a relevant negative modulator of both dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptor-mediated behaviors, a finding that may contribute to our understanding of basal ganglia motor disorders.

*Neuropsychopharmacology* (2008) **33**, 1667–1679; doi:10.1038/sj.npp.1301558; published online 24 October 2007

**Keywords:** cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors; dopamine D<sub>1</sub> receptors; basal ganglia; motor control; striatum

## INTRODUCTION

Cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors are expressed in brain areas that contribute to movement such as the basal ganglia. The highest concentration of CB<sub>1</sub> receptors is found in the striatum, where they colocalize with dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors in striatal neurons (Herkenham *et al*, 1990, 1991; Tsou *et al*, 1998; Hermann *et al*, 2002; Julián *et al*, 2003). However, their regional and neuronal distribution has not

been established. It is known that there is a continuous release of endogenous cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor agonists such as anandamide in the brain, and that these endogenous agonists exhibit neurotransmitter function (Giuffrida *et al*, 1999; Baker *et al*, 2000). The endocannabinoid system can act as a modulator of dopaminergic neurotransmission in the basal ganglia (Cadogan *et al*, 1997; Glass and Felder, 1997; Pertwee, 1999; Giuffrida *et al*, 1999; Beltramo *et al*, 2000; Gerdeman and Lovinger, 2001; Gubellini *et al*, 2002). Endogenous cannabinoids have been proposed to act in a homeostatic mechanism in the basal ganglia by activating CB<sub>1</sub> receptors, which appear to function as a brake on dopaminergic function in the striatum (Rodriguez de Fonseca *et al*, 1994, 1998).

Although much is known about the central effects of exogenously applied cannabinoids, the functional relevance of the endogenous cannabinoid system needs further investigation. In this context, the discovery of the highly potent CB<sub>1</sub> receptor antagonist, SR141716A, and the

\*Correspondence: Dr E Fernandez-Espejo, Departamento de Fisiología Médica, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla, Sevilla 41009, Spain, Tel: + 34 95 455 6584, E-mail: efespejo@us.es or Dr FR de Fonseca, Fundación IMABIS, Hospital Regional Universitario Carlos Haya, Málaga 29010, Spain, Tel: + 34 95 103 0447, E-mail: fernando.rodriguez@fundacionimabis.org or Dr R Moratalla, Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid 28002, Spain, Tel: + 34 91 585 4705, Fax: + 34 91 585 4754, E-mail: moratalla@cajal.csic.es  
Received 3 January 2007; revised 5 July 2007; accepted 31 July 2007

# Genetic Inactivation of Dopamine D1 but Not D2 Receptors Inhibits L-DOPA-Induced Dyskinesia and Histone Activation

Sanja Darmopil, Ana B. Martín, Irene Ruiz De Diego, Sara Ares, and Rosario Moratalla

**Background:** Pharmacologic studies have implicated dopamine D1-like receptors in the development of dopamine precursor molecule 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine (L-DOPA)-induced dyskinesias and associated molecular changes in hemiparkinsonian mice. However, pharmacologic agents for D1 or D2 receptors also recognize other receptor family members. Genetic inactivation of the dopamine D1 or D2 receptor was used to define the involvement of these receptor subtypes.

**Methods:** During a 3-week period of daily L-DOPA treatment (25 mg/kg), mice were examined for development of contralateral turning behavior and dyskinesias. L-DOPA-induced changes in expression of signaling molecules and other proteins in the lesioned striatum were examined immunohistochemically.

**Results:** Chronic L-DOPA treatment gradually induced rotational behavior and dyskinesia in wildtype hemiparkinsonian mice. Dyskinetic symptoms were associated with increased FosB and dynorphin expression, phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase, and phosphoacetylation of histone 3 (H3) in the lesioned striatum. These molecular changes were restricted to striatal areas with complete dopaminergic denervation and occurred only in dynorphin-containing neurons of the direct pathway. D1 receptor inactivation abolished L-DOPA-induced dyskinesias and associated molecular changes. Inactivation of the D2 receptor had no significant effect on the behavioral or molecular response to chronic L-DOPA.

**Conclusions:** Our results demonstrate that the dopamine D1 receptor is critical for the development of L-DOPA-induced dyskinesias in mice and in the underlying molecular changes in the denervated striatum and that the D2 receptor has little or no involvement. In addition, we demonstrate that H3 phosphoacetylation is blocked by D1 receptor inactivation, suggesting that inhibitors of H3 acetylation and/or phosphorylation may be useful in preventing or reversing dyskinesia.

**Key Words:** Dopaminergic denervation, dynorphin, ERK1/2, FosB, Parkinson's disease, phosphoacetylated histone 3

Parkinson disease (PD) is caused by degeneration of mid-brain dopaminergic neurons that project to the striatum. Despite extensive investigation and new therapeutic approaches, the dopamine precursor molecule 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine (L-DOPA) remains the most effective and most commonly used noninvasive treatment for PD. However, chronic treatment and disease progression lead to changes in the brain's response to L-DOPA, resulting in a lower therapeutic window and the appearance of abnormal involuntary movements. These movements, known as dyskinesias, interfere significantly with normal motor activity and are associated with changes in striatal gene expression.

Our hypothesis is that these changes are the result of intermittent stimulation of supersensitive dopamine receptors in denervated striatal neurons (1). These receptors have increased coupling to  $G_{\alpha_{olf}}$  (2), resulting in greater stimulation of adenylyl cyclase, which activates the extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway (3) and triggers posttranslational modification of histones (4), leading to gene transcription (5). All dopamine receptor (R) subtypes (D1–D5) are present in the striatum, although D1R and D2R are the most abundant. These two dopamine receptors exhibit opposite functions, and their expres-

sion is segregated: D1R and D2R are expressed in neurons of direct and indirect striatal output pathways, respectively. Some molecular changes correlated with dyskinesias such as increased FosB and dynorphin expression are confined to D1R-containing neurons, whereas p-ERK and Nurr1 expression have been described in both D1R- and D2R-containing neurons (6,7). Although dopamine receptors are clearly involved in dyskinesias, the contribution of each dopamine receptor subtype has not been demonstrated definitively, and the signaling pathways that trigger long-term changes that maintain dyskinesias are not fully defined.

Pharmacologic studies implicate both the D1/D5 and D2/D3 receptor families in the development of dyskinesias. In patients, chronic treatment with a nonselective dopamine agonist with a short plasma half-life is more likely to induce dyskinesia than treatment with D2R agonists with long plasma half-lives (8). In rodents, dyskinesias can be induced by D1-type (D1/D5) or D2-type (D2/D3) agonists (9–12) with D1/D5 agonists having the most powerful dyskinetogenic effect (7,12,13). Consistent with this, D1/D5 antagonists are more effective inhibitors of L-DOPA-induced dyskinesia than D2 antagonists (7,12–14).

Because D1 receptors greatly outnumber D5 receptors in the striatum, it is tempting to assume that the striatal actions of mixed D1/D5 ligands are due to the D1 receptor. However, there are several examples in which the less abundant dopamine receptor is the major player for specific functions. In the hippocampus, D5R are much more abundant than D1R, but the D5 receptors do not play a role in spatial learning or hippocampal long-term potentiation, whereas D1 receptors are critical in these processes (15). In addition, within the striatum itself, where D1 is predominant, D1 and D5 receptors are equally required for striatal

From the Cajal Institute, Consejo Superior de Investigaciones Científicas and Centro de Investigación Biomédica en Red para Enfermedades Neurodegenerativas, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

Address correspondence to Rosario Moratalla, Ph.D., Cajal Institute, Avenida Dr. Arce 37, 28002 Madrid, Spain. E-mail: moratalla@cajal.csic.es.

Received Feb 12, 2009; revised Apr 7, 2009; accepted Apr 17, 2009.